



Utilização do composto orgânico de larvas da *Hermetia illucens* como fertilizante em alface

Catarina Filipa Martins Esteves

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Com especialização em Hortofruticultura e Viticultura

Orientadoras: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Doutora Maria Regina Rodrigues de Sousa Botelho de Gusmão Valério
Menino

Júri:

Presidente: Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutor David Paulo Figueiro, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Regina Rodrigues de Sousa Botelho de Gusmão Valério Menino, Investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero dedicar a presente tese à minha mãe, Catarina Martins, e agradecer por todo o amor, pela confiança, pelo carinho e apoio incondicional, e sem a qual nenhum dos meus sonhos se realizaria. Quero agradecer também ao meu irmão, Diogo Esteves, que foi também fundamental no processo de escrita, fornecendo-me espaço e sossego para me concentrar e por toda a motivação que ele me proporciona. Um grande obrigado à minha restante família por nunca duvidarem de mim e por todo o amor que me dão. Quero alargar os meus agradecimentos à Alice Lopes, David Santos, Mariana Rato e Mariana Teixeira, pela força de vontade que me emprestaram.

Quero também agradecer às minhas excelentes orientadoras, à Dra. Mariana Mota, por acreditar em mim e por toda a compreensão, ajuda e honestidade. O mesmo se estende à Dra. Regina Menino, cujo apoio foi incondicional e excecional, na medida em que me forneceu todo o material que precisava para a escrita e que me educou sobre rigor científico, e ainda por despertar o meu interesse na área de investigação. Quero agradecer às Doutoradas por todas as palavras de força e coragem, por terem visto potencial em mim, o que me permitiu ambicionar novos projetos e aumentar a minha autoconfiança. Sem elas, a presente tese não seria possível.

Os meus agradecimentos especiais à Dra. Paula Fareleira, à Lurdes Cravo e à Rosa Rocha, que me ajudaram tremendamente ao longo da tese e que animaram os meus dias.

E em último lugar, quero agradecer ao ISA, pelos valiosos anos de ensino e pelo material fornecido que permitiu montar o presente ensaio; ao INIAV, pelas instalações e apoio indispensáveis e à Entogreen, por ter fornecido o composto, com um agradecimento especial ao Dr. Daniel Murta, pelo brilhante projeto onde me inseriu.

Suporte



Financiamento

Tese desenvolvida no âmbito do projeto EntoValor (POCI-01-0247-FEDER-017675)

Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Resumo

É já conhecido o uso de dípteros para degradar resíduos orgânicos, sendo a mosca soldado negro (MSN), *Hermetia illucens* L., muito promissora, uma vez que na fase larvar se alimenta vorazmente, incorporando gordura e proteína na massa corporal, produzindo um composto orgânico, que é um potencial fertilizante orgânico, devido à sua composição em nutrientes vegetais e matéria orgânica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito fertilizante do composto da MSN na cultura da alface e na qualidade do solo. Para o efeito foi instalado um ensaio de vasos na estufa do INIAV (Oeiras, Portugal), por um período de 6 semanas. O delineamento experimental consistiu em 6 modalidades, definidas com base na dose de N exigida pela cultura (1,5 g/planta), nomeadamente: controlo - sem fertilização; Tm - fertilização mineral; T4 - 1/3 mineral e 2/3 composto MSN; e 3 modalidades, T1, T2 e T3, respetivamente, com 50%, 100% e 150% das necessidades em N, via composto MSN. Os vasos foram regados diariamente, garantindo 80% da capacidade de campo. No início e no final do ensaio, fizeram-se análises químicas ao solo e às plantas, avaliou-se a biomassa vegetal e a atividade enzimática do solo. Os resultados revelaram menor produtividade nas modalidades que receberam o composto MSN, provavelmente devido à mineralização lenta dos compostos orgânicos em conjugação com uma cultura de ciclo-curto (alface). O teor foliar em N foi significativamente superior nas modalidades Tm e T4. Porém, o composto orgânico aumentou significativamente o conteúdo de nutrientes do solo e a atividade enzimática da desidrogenase e da β -glucosidase. Perante os resultados obtidos, conclui-se que, apesar de não ter tido eficácia como fertilizante na cultura da alface e nas condições do presente ensaio, o composto da MSN revelou potencial como corretivo orgânico, ao aumentar significativamente a atividade microbiana do solo, relacionada com a melhoria da qualidade do mesmo.

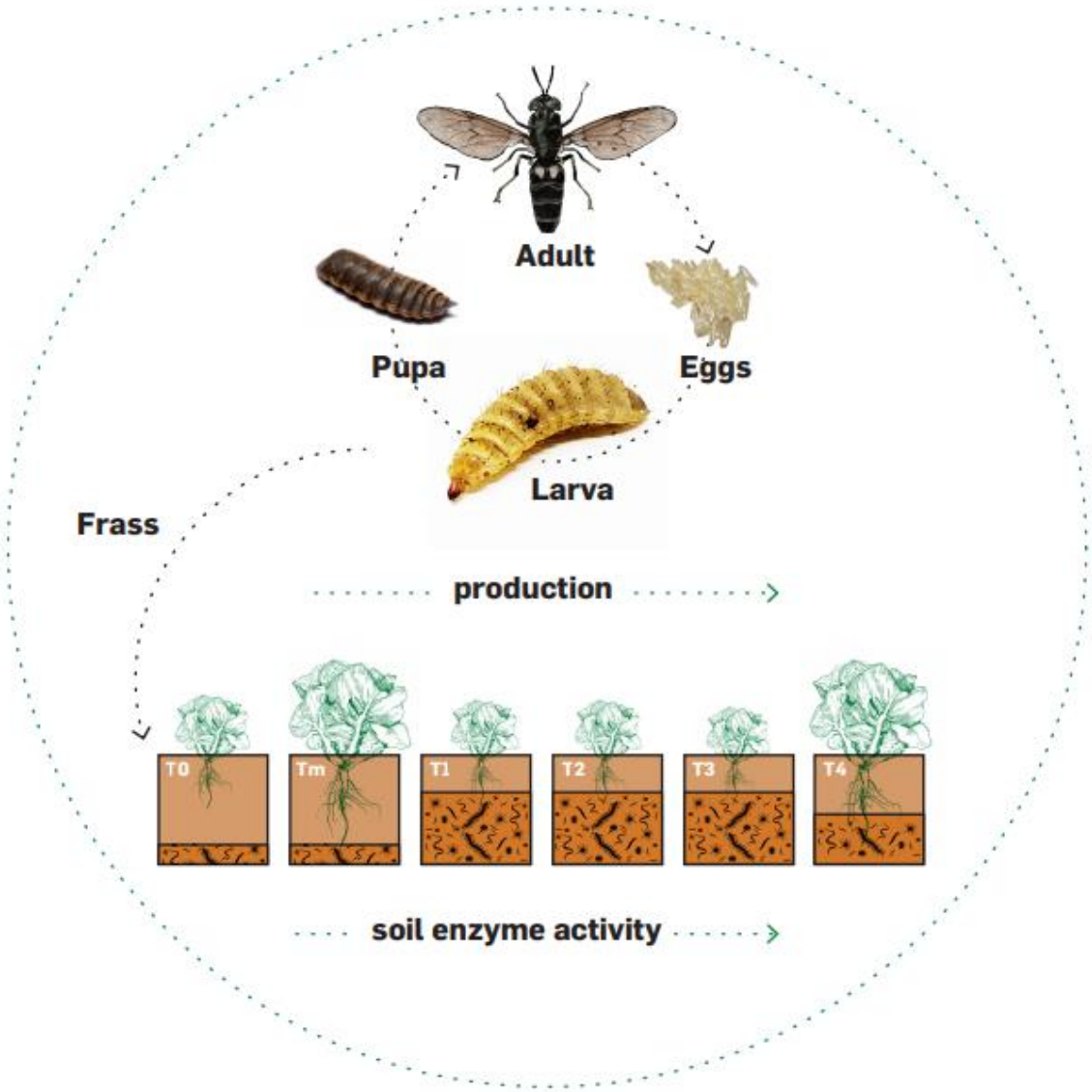
Palavras-chave: composto orgânico, Mosca soldado negro, economia circular, alfaces, ensaio em vasos

Abstract

The use of dipterans to degrade organic waste is already known, and the black soldier fly (BSF), *Hermetia illucens* L., is very promising, since in the larval phase it eats voraciously, incorporating fat and protein in body mass, creating a value-added compost (frass - BSFF), which is a potential organic fertiliser, due to its composition in plant nutrients and organic matter. This study aimed to evaluate the fertiliser value of BSFF on lettuce culture and on soil quality. For this purpose, a pot experiment was installed in the INIAV greenhouse (Oeiras, Portugal), for a period of 6 weeks. The experimental design consisted of 6 treatments, defined based on the N amount needed by the crop (1.5 g/plant), namely: control – without fertilization; Tm - mineral fertilisation; T1, T2 and T3 - 50, 100 and 150% of the N needs, via BSFF, respectively; and T4 - 1/3 mineral N and 2/3 organic N (BSFF). The pots were watered daily, guaranteeing 80% of the field capacity. At the beginning and at the end of the assay, chemical analyses were performed on the soil and plants, and plant biomass and the enzymatic activity were also assessed. The results revealed smaller productivity in the treatments that received BSFF, probably due to the slow mineralisation rate of organic compounds, along with a short-cycle plant (lettuce). The leaf N content was significantly higher in the Tm and T4 treatments. However, the BSFF significantly increased the nutrient content of the soil and the enzymatic activity of dehydrogenase and of β -glucosidase. In view of the results obtained, it is concluded that, despite not being effective as a fertilizer in the lettuce culture, in the conditions of the present experiment, the BSFF showed potential as an organic amendment, by significantly increasing microbial activity of the soil, related to the improvement of its quality.

Key words: BSF frass, circular economy, organic fertiliser, lettuces, pot trial

Resumo gráfico



Publicações no âmbito da presente dissertação

Regina Menino, **Catarina Esteves**, Fernando Felizes, Amélia Castelo Branco, Paula Fareleira, Mariana Mota, Daniel Murta, 2020. Soil dynamics and biomass production in short- and long-cycle crops by incorporation of Black Soldier Fly larvae frass, (aceite para comunicação oral no 71º Encontro da European Association for Animal Production (EAAP), que se irá realizar em Dezembro de 2020).

“Synthetic fertilizers use, in agricultural soils, contributes to increased production but has detrimental effects in what environment concerns; one alternative to face this conundrum, pointed out as a friendly one, is the use of organic compounds, being the Black Soldier Fly larvae Frass (BSFF) a recent candidate. Some studies to evaluate the effect of this organic fertilizer on crop production have been already produced; however, there is yet a paucity of information on its environmental impact. The present work is based on studies carried out to evaluate the potential fertilizing effect of BSFF in two crops, namely: (a) a “long-cycle crop” (*Lolium multiflorum* L.), for which it was registered a significant increase of production and soil residual organic matter and mineral components, together with a significant increase of soil residual dehydrogenase activity; (b) a “short-cycle crop” (*Lactuca sativa* L. var. capitata), for which the effect of BSFF on production was not relevant but the soil residual chemical composition and microbiological activity was significantly increased. The conclusion is that BSFF can be an efficient fertilizer when there is time for nutrients mineralization (long standing crops) and it is, in any case, a guaranty for the sustainability of soil fertility.”

Catarina Esteves, Paula Fareleira, Maria Amélia Castelo-Branco, Mariana Mota, Daniel Murta e Regina Menino. “Black Soldier Fly larvae Frass increases the soil residual nutrient content and its enzymatic activity – a lettuce production trial”. (artigo submetido para publicação na revista *Nutrient Cycling in Agroecosystems*)

“The aim of this study was to evaluate the potential agronomic value of Black Soldier Fly larvae Frass (BSFF), as organic fertilizer in short-cycle crops, using lettuce as the test plant. The experimental alternatives (beside the non-fertilized control) comprised mineral, organic (three progressive doses) and mixt (1/3 mineral and 2/3 BSFF) fertilization. Production was assessed by the measure of aerial plant biomass, and residual soil fertility evaluation was based on mineral composition and microbiological activity of soil after harvest. The higher yields were obtained with an exclusive mineral fertilization and with a mixture organic/mineral fertilization, probably due to the slow mineralisation rate of the N provided by BSFF, along with the choice of a short-cycle plant, such as lettuce, that requires the nutrients readily available. Nevertheless, the BSFF increased the soil's residual nutrient content, as well as enzymatic activity of dehydrogenase and β -glucosidase. Thus, despite not being effective as an exclusive fertilizer for a short cycle culture, the BSFF, included in a mixture with mineral fertilization, may compete with exclusive mineral fertilization with the added value of improving sustainability of soil fertility.”

Catarina Esteves, Regina Menino, Maria Amélia Castelo-Branco, Paula Fareleira, Mariana Mota, Daniel Murta, 2019. The use of Black Soldier Fly larvae frass as organic fertiliser for lettuce – a study, **IV Encontro de Estudantes de Doutoramento em Ambiente e Agricultura**, Évora. (Livro de resumos: Laranjo, M., Alexandre, A., Marques, C. (2019). IV PhD Students Meeting in Environmental and Agriculture. Book of abstracts. Pólo da Mitra, Universidade de Évora. pp. 44)





The use of Black Soldier Fly larvae frass as organic fertiliser for lettuce – a study

Catarina Esteves¹, Regina Menino², Maria Amélia Castelo-Branco², Paula Fareleira², Mariana Mota³, Daniel Murta^{4,5,6}

¹Mestrado em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal; ²Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV), Av. da República, Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras, Portugal; ³EAF/DCEB-Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal; ⁴EntoGreen - Ingredient Odyssey, Santarém, PORTUGAL; ⁵CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, PORTUGAL; ⁶CBIOS, Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University of Humanities and Technologies, Campo Grande, Lisboa, PORTUGAL.

*E-mail: catarinaestevess1@campus.ul.pt

Introduction and aims

The use of flies, such as **Black Soldier Fly** (*Hermetia illucens* L.), as composters of organic wastes is an opportunity to increase the efficiency of nutrient production, as they allow the production of both animal feed (the larvae, after recycling of the vegetal debris) and organic fertilizer (insect frass). This organic fertilizer, rich in organic matter and plant nutrients, is likely to replace chemical fertilisers, much needed in Portugal's poor soils. The aim of this study is to evaluate the agronomic potential of the BSF frass (BSFF) as organic fertiliser, using lettuce as plant test.



Experimental Design

POT EXPERIMENT IN GREENHOUSE

Soil: Haplic Fluvisol, collected from Ribatejo, Portugal

Treatments (with five replicates each):

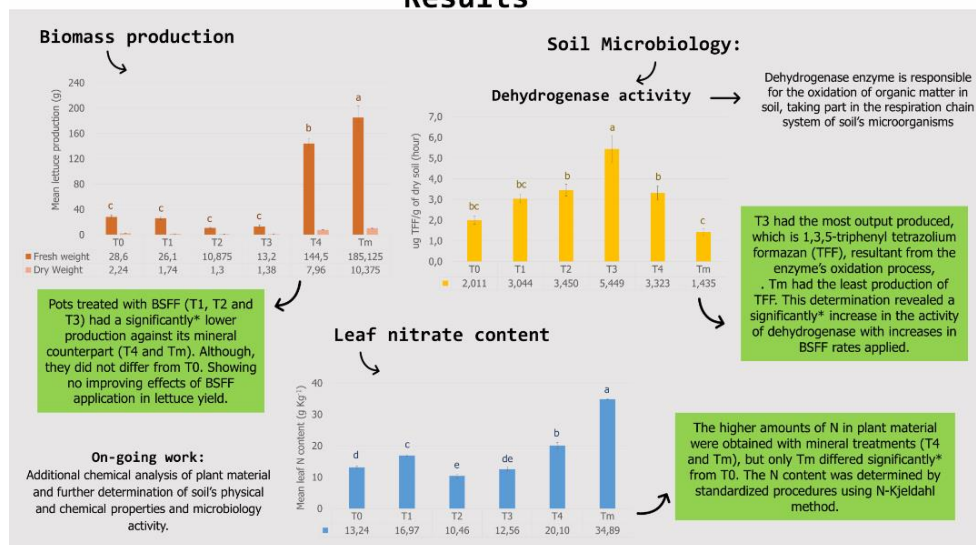
- T0, that didn't receive any fertilisation (control);
- T1, received 50% of N plant demand through BSFF;
- T2, received 100%, through BSFF;
- T3, received 150%, through BSFF;
- T4, which received 1/3 via mineral and the rest via BSFF;

And finally, Tm, that received recommended mineral fertilisation, using a 7-14-14 fertiliser at depth (1/3) and urea, with 46% N content, at surface (2/3).

Plant species: Lettuce var. crisp (one-month duration)

BSF frass: produced by Entogreen® and resulted from the digestion of agro-industrial by-products by the BSF larvae.

Results



*means with the same letter do not differ significantly (p≤0.05), as assessed by the Tukey test

Acknowledgements

The research that yielded these results was funded by PT2020 through the project POCI-01-0247-FEDER-017675: ENTOVALOR – Insects as an opportunity in residues valorization (2016-2019).

Conclusions

In the present study it was concluded that BSFF had a better effect on soil's microbiological activity, acting as an organic concealer rather than a fertiliser. Regarding biomass production, the low results may be explained by the slow mineralisation rate of organic composts along with the choice of using a short life cycle and rapid growth plant, such as lettuce, that requires high nutrient availability. However, there is a need for more experiments, either with different cultures or different edaphoclimatic conditions in order to obtain consistent conclusions.

Catarina Esteves, Regina Menino, Maria Amélia Castelo-Branco, Paula Fareleira, Mariana Mota, Daniel Murta, 2019. Effects of Black Soldier Fly larvae insect frass as organic fertilizer in ryegrass and lettuce production. Painel apresentado no International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF) International Workshop, realizado em Bruxelas, em Dezembro de 2019.



Introduction and aims

The significant increase in world population expected will naturally be accompanied by an increase in animal and vegetable production. About 75% of the agricultural land is intended for animal feed production, the few area remaining is for production for human consumption.

There is a considerable volume of agro-industrial by-products that cause environmental problems, these can be degraded by insects promoting an increase in nutrient production efficiency, in a circular economy concept.

Hermetia illucens, known as Black Soldier Fly (BSF), is one of the best candidates, allowing the production of animal feed (rich fat and protein larvae) and organic compost (larvae frass) (BSFF).

Alongside with the negative effect that mineral fertilizers can have on ecosystems, efforts are being made to revert to traditional organic fertilization by studying alternatives from different sources. In this context, the recovery of agro-industrial by-products should be considered for the advantages it has in allowing the reintroduction of lost nutrients back to the value chain, increasing the efficiency of natural resource use, being the BSF frass one of the alternatives. The fact that it is an innovation requires studies to evaluate the effects on the environment and crop production.

In the present work are presented results of preliminary studies carried out to evaluate the potential fertilizing effect of BSFF in crops such as ryegrass (animal feed) and lettuce (human food).

Experimental Design

POT EXPERIMENT IN A GREENHOUSE

Soil: Haplic Fluvisol

Plant species: lettuce var. crisp (one-month duration) and ryegrass (cuts every 5 weeks, in a total of 5 cuts)

Treatments: both experiment blocks had a control (T0), different application rates of BSFF (calculated based on the N demand by the culture) and in the case of the lettuce, a mineral treatment (Tm) and a 1/2mineral+2/2BSFF (T4). Each replicated 3 times.

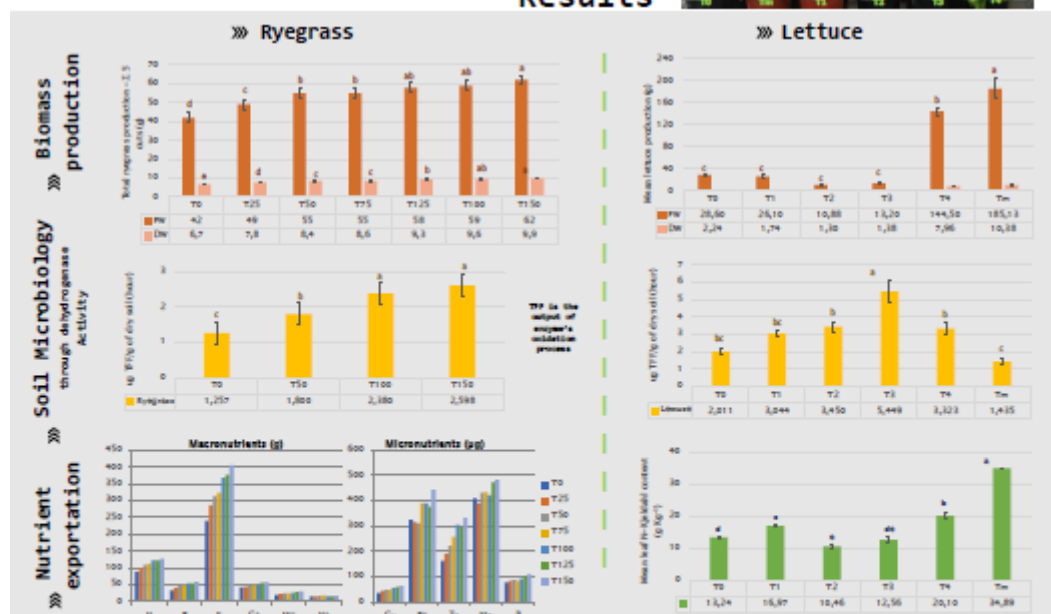
BSF frass (EntoHumus[®]): produced by Entogreen[®] and resulted from the digestion of agro-industrial by-products by the BSF larvae

Assessments: biomass production, chemical compositions and microbial activity.

* During the plant growth, the pots were regularly watered, with deionized water, to maintain the soil moisture near to 80% of water holding capacity



Results



* Treatments with the same letter do not differ significantly (p<0.05), as assessed by the Tukey test.

Acknowledgements

The research that yielded these results was funded by PT2020 through the project POCI-01-0247-FEDER-017675: ENTOMVALOR - Insects as an opportunity in residues valorization (2016-2019).

Conclusions

There was a positive impact on ryegrass production with BSFF fertilization, however, in the case of lettuce there was no increase in yield, but there was a beneficial effect on soil microbial activity. Under current conditions, the results showed a positive effect caused by the use of BSFF. Nevertheless, there is a need for more experiments, either with different cultures or different edaphoclimatic conditions in order to obtain consistent conclusions.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Suporte.....	iii
Financiamento.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Resumo gráfico.....	vi
Publicações no âmbito da presente dissertação.....	vii
Lista de Quadros.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
Introdução.....	1
1. Revisão Bibliográfica.....	3
1.1 A alface (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	3
1.1.1. Classificação taxonómica e descrição.....	3
1.1.2. Morfologia e ciclos.....	4
1.1.3. Produção da alface em Portugal e no mundo.....	4
1.1.4. Produção e fatores de qualidade.....	7
1.1.5. Exigências edafo-climáticas.....	9
1.1.6. Nutrição vegetal.....	11
1.1.7. Fertilização da alface.....	17
1.2. Processos de valorização de subprodutos agrícolas.....	20
1.2.1. Compostagem.....	21
1.2.2. Vermicompostagem.....	22
1.2.3. Utilização da mosca soldado negro na valorização dos subprodutos agrícolas e produção de compostos orgânicos.....	23
1.2.3.1. Hábitos e ciclo de vida da MSN.....	25
1.2.3.2. O composto orgânico.....	28
1.2.3.3. Outras finalidades.....	29
1.2.3.4. Modo de produção do composto.....	32
1.3. Métodos para avaliar a influência do composto na planta e no solo.....	33

1.3.1.	Análises químicas.....	34
1.3.2.	Avaliação da actividade enzimática	34
2.	Material e métodos	36
2.1.	Ensaio experimental	36
2.2.	Métodos para avaliação do composto orgânico	39
2.3.	Métodos para a avaliação química do solo	39
2.4.	Métodos para a determinação da atividade microbiana no solo	41
2.5.	Métodos para a avaliação química do material vegetal.....	42
2.6.	Análise estatística.....	43
3.	Resultados e discussão	44
3.1.	Composição físico-química do composto.....	44
3.2.	Caracterização do solo usado no ensaio	46
3.2.1.	Composição química	46
3.2.2.	Atividade microbiana	48
3.3.	Avaliação do material vegetal	52
3.3.1.	Produção de biomassa	52
3.3.2.	Composição química	54
3.4.	Outras considerações.....	60
4.	Conclusões.....	62
	Bibliografia.....	64
	Anexo	71

Lista de Quadros

Quadro 1 - Superfície cultivada e produção da cultura da alface nos anos 2016, 2017 e 2018 em Portugal, comparadas com o valor total no setor das hortícolas (INE, 2019)..	5
Quadro 2 - Importações e exportações da alface e da chicória, em 2018, e o preço anual no produtor, nos anos 2016, 2017 e 2018 (Fonte: INE, 2019).	7
Quadro 3 - Sugestão de plantação e colheita, tendo em conta a época e modo de produção (Fonte: Lopes e Simões, 2006)	8
Quadro 4 – Quadro resumo de alguns parâmetros das preferências edafo-climáticas da alface (Almeida, 2013).	11
Quadro 5 - Valores foliares de referência de macro e micronutrientes para a cultura da alface (da folha intermédia completamente desenvolvida a meio do ciclo vegetativo) (Lopes e Simões (2006)).	20
Quadro 6 – Exportação total de nutrientes, pela parte aérea da planta, para os tipos bola de manteiga e batávia, tendo em conta a produtividade da alface (Almeida, 2013).	20
Quadro 7 - Descrição das modalidades.	38
Quadro 8 - Caracterização físico-química do composto orgânico usado no ensaio. ...	44
Quadro 9 - Resultados das análises químicas realizadas ao solo, antes e depois do ensaio.	46
Quadro 10 – Resultados da atividade enzimática da desidrogenase, reportado ao valor médio dos 5 vasos, por modalidade.	49
Quadro 11 - Diferença das diferentes modalidades em relação ao T0, que não recebeu nenhuma fertilização, em %, no caso do ensaio da desidrogenase.	50
Quadro 12 - Resultados da atividade enzimática da β -glucosidase, reportado ao valor médio dos 5 vasos, por modalidade.	50
Quadro 13 - Diferença das diferentes modalidades em relação ao T0, que não recebeu nenhuma fertilização, em %, no caso do ensaio da β -glucosidase.	51
Quadro 14 - Valor médio (n=5) da produção (g) de alface, em cada tratamento.	52
Quadro 15 - Conteúdo em nutrientes (valores totais) do material vegetal, no início e no fim do ensaio.	55
Quadro 16 - Exportação média de nutrientes do material vegetal (média dos 5 vasos), por modalidade.	57

Lista de Figuras

Figura 1 - Histórico da produção de alface e chicória em Portugal entre 1970 e 2017 (Fonte: FAOSTAT, acedido a 26.7.2019).....	6
Figura 2 – Plano coronal da Mosca soldado negro. Fotografia retirada do site: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/217341?lg=en , acedido em 7/4/2020.	26
Figura 3 - Ciclo de vida da <i>Hermetia illucens</i> , segundo Smet et al. (2018).....	27
Figura 5 - Demonstração do processo realizado na obtenção do composto e como representa um exemplo de economia circular (retirado do site da Entogreen: https://www.entogreen.org/pt/entovalor/).....	33
Figura 4 - Exemplo de um lote de larvas desidratadas, produzidas nas instalações da Entogreen, e retirado do site da Entogreen: https://www.entogreen.org/pt/entovalor/ .	33
Figura 6 - As diferentes unidades de um sistema de tratamento de resíduos utilizando a MSN, sugerido por Eawag (Dortmans et al., 2017).	33
Figura 7 - Vista aérea das estufas onde foi realizado o ensaio.	36
Figura 8 - Interior da estufa, com pormenor da ventoinha e da rede de ensombramento.....	36
Figura 9 – Fotografia tirada após a plantação das alfaces.	38
Figura 10 - Digestor móvel, usado no fabrico do composto (protótipo da Entogreen (DGAV, 2018)).....	45
Figura 11 - Alfaces no fim do ensaio, onde a diferença do desenvolvimento das alfaces é bastante distinguível entre as modalidades, onde Tm e T4 produziram maiores alfaces e com folhas mais saudáveis, e as modalidades orgânicas (T1, T2 e T3) produziram alfaces pequenas e com algumas folhas bastante cloróticas.	53
Figura 12 - Pormenor de cloroses das folhas mais velhas, sintomas de podem indicar deficiência de azoto na planta. Neste caso, num vaso da modalidade T3.....	56
Figura 13 - Comparação de uma alface T3 e de uma alface Tm, no fim do ensaio, em que a alface T3 apresenta um crescimento muito reduzido, com folhas pequenas e cloróticas, enquanto que a alface Tm apresenta folhas significativamente maiores e mais verdes, com um crescimento muito superior em relação à T3.	58
Figura 14 - Aparecimento de limo (manchas verdes) na superfície do solo, que é uma vegetação que surge em condições de muita humidade.....	59
Figura 15 - Alfaces a rebentarem do colo da raiz nas modalidades orgânicas e no controlo (ordem dos vasos (da esquerda para a direita): T0, Tm, T1, T2, T3 e T4).....	61
Figura 16 - Unidade de digestão para a determinação de N-Kjeldahl e respetivos tubos.....	71

Figura 17 - Unidade de destilação Kjelttec 1026, para a realização do método de Kjeldahl.....	71
Figura 18 - Espectrofotômetro de absorção molecular Thermo Scientific Evolution 201, para a determinação de P.....	72
Figura 19 - Espectrofotômetro de absorção atômica Thermo Scientific iCE 3000 series, para a determinação de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu.	72
Figura 20 - Fotômetro de chama da Sherwood Scientific modelo 410, para a determinação de K e Na.	73
Figura 21 - Espectrofotômetro, usado nos ensaios das enzimas, Specgene da Techne (descontinuados, agora são produzidos pela Jenway©).	73
Figura 22 - À esquerda a centrífuga 5415 C e à direita a centrífuga MiniSpin®, ambas da Eppendorf.	74
Figura 23 - Resultados do ensaio da atividade enzimática de desidrogenase, na seguinte ordem: T0, T1, T2, T3, T4 e Tm (cada ensaio representa 1 repetição, das 5 repetições delineadas). Esta fotografia mostra a intensidade da cor dos sobrenadantes, evidenciando a grande diferença dos níveis de atividade entre as modalidades.	74
Figura 24 - Resultados do ensaio da atividade enzimática de desidrogenase, na seguinte ordem: T0, T1, T2, T3, T4 e Tm (cada ensaio representa 1 repetição, das 5 repetições delineadas).....	75

Lista de Abreviaturas

BSF – Black soldier fly (língua inglesa)

BSFF – Black soldier fly frass (língua inglesa)

Ca – Cálcio

CE – Condutividade Elétrica

Cu – Cobre

Fe – Ferro

INE – Instituto Nacional de Estatística

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

K – Potássio

LQARS – Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

MO – Matéria orgânica

MSN – Mosca soldado negro

MSNL – Larvas da mosca soldado negro

N – Azoto

Na – Sódio

P – Fósforo

Zn – Zinco

Introdução

Estima-se que a população mundial vai aumentar 30% até 2050, o que implica o aumento do consumo de recursos e da produção de resíduos (Pastor *et al.*, 2015). Para alimentar os 9,3 mil milhões de habitantes previstos (FAO, 2014), vai ser preciso aumentar a produção de alimentos de 8,4 mil milhões para 13,5 mil milhões de toneladas anuais (FAO, 2014). Do ponto de vista agro-pecuário, significa um aumento da produtividade dos sistemas agrários e pecuários, num ecossistema com escassez de terra arável e com aplicações excessivas de adubos minerais e tratamentos químicos, especialmente em Portugal, onde a generalidade dos solos é pobre em matéria orgânica.

Por sua vez, o desperdício alimentar, que atualmente ronda as 1,3 mil milhões de toneladas anuais (FAO, 2014), vai também acompanhar a subida de produção, que se traduz na perda de nutrientes na cadeia de valor. Para além disso, ainda sobram os subprodutos da produção agrária, que correspondem a mais de metade de toda a fitomassa produzida e que não são adequadamente aproveitados, uma vez que grande parte são queimados (Smill, 1999).

Surge, assim, a oportunidade do reaproveitamento e valorização dos subprodutos mencionados, aos quais também se podem juntar outros resíduos orgânicos, municipais ou de indústrias, através de processos de transformação. Processos esses como a compostagem, ou decomposição anaeróbica, cujo produto final é um composto orgânico, que pode ser aplicado ao solo como fertilizante orgânico, contribuindo, deste modo, para uma economia circular, com redução dos impactes ambientais.

O uso de dípteros, como a mosca soldado negro, *Hermetia illucens* L., como agente na bioconversão dos resíduos orgânicos tem sido amplamente sugerido, uma vez que as larvas deste inseto, devido ao sistema digestivo, são capazes de digerir e degradar diferentes compostos orgânicos. Da sua digestão resultam dois produtos finais, ambos extremamente importantes para responder a este aumento populacional, nomeadamente: um composto orgânico, rico em matéria orgânica, nutrientes e outros constituintes benéficos para as plantas, com potencial para ser usado como fertilizante ou corretivo orgânico, melhorando as características físico-químicas e biológicas dos solos, permitindo o aumento da produtividade e a substituição de fertilizantes minerais, que são mais dispendiosos (Odlare *et al.*, 2011); e as próprias larvas que, enquanto se alimentam, acumulam gordura e proteína em massa corporal e, como tal, constituem

um excelente substituto do bagaço de soja e da farinha de peixe na alimentação de alguns animais de consumo, cuja obtenção tem maiores impactos ambientais, uma vez que conduzem à sobre-exploração e esgotamento de recursos. Além destes, também se pode extrair a gordura para produzir biodiesel e a quitina, presente na epiderme das larvas, para fins medicinais (Diener *et al.*, 2011).

Esta dissertação surge, no presente contexto, para estudar e avaliar a capacidade fertilizante do composto orgânico resultante da digestão de subprodutos agroalimentares pelas larvas da mosca soldado negro, numa perspetiva mais sustentável e com capacidade para ser rentável. A FAO (2013) reforça esta iniciativa, já que refere que é necessário “expandir e acelerar a transição para comida e agricultura sustentável, que garanta segurança alimentar mundial [...] e que proteja os ecossistemas de quem a agricultura tanto depende”.

Para tal, estabeleceu-se um ensaio em vasos, nas estufas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), em Oeiras, usando, como material de referência, alfices de variedade frisada, tendo-se testado várias doses do composto orgânico (digerido das larvas da mosca soldado negro) contra um adubo mineral. O ensaio experimental consistiu em seis modalidades, com 5 repetições cada, com o objetivo de avaliar o poder fertilizante do composto orgânico, aferido pelas seguintes características: produção de biomassa (peso verde e peso seco); características químicas do solo (pH, MO, macro e micronutrientes); atividade microbiana do solo e; exportação de macro e micronutrientes pelo material vegetal.

Enquanto a investigação da bioconversão de resíduos provenientes da pecuária por larvas da MSN começa a ser extensa, ainda falta informação relativa à transformação de subprodutos da agricultura e agro-indústria por estes insetos (Bloukounon-Goubalan *et al.*, 2019). Assim sendo, a presente tese pretende ser um contributo para o conhecimento nesta área, através do estudo do potencial fertilizante do composto (referido como ‘frass’ na bibliografia inglesa) resultante da bioconversão de subprodutos agroalimentares, efetuada pelas larvas da mosca soldado negro.

O presente ensaio está integrado no projeto POCI-01-0247-FEDER-017675: ENTOVALOR – Insetos como uma oportunidade na valorização de resíduos (2016-2019), financiado pelo PT2020, liderado pela Entogreen e com a colaboração do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) e mais 3 parceiros.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 A alface (*Lactuca sativa* L.)

1.1.1. Classificação taxonômica e descrição

A alface é uma herbácea anual e é uma das cem espécies pertencentes ao género *Lactuca*, da família Asteraceae, anteriormente conhecida como Compositae. A cultura aparece associada à chicória, em algumas literaturas, uma vez que o seu género, *Chicorium*, é muito próximo do género da alface.

De acordo com Gardé e Gardé (1981), a alface é originária do Médio Oriente e da região Mediterrânea, sendo que as primeiras provas do seu cultivo vêm de pinturas existentes nos túmulos egípcios, datando 4500 a.C. A espécie da alface é, possivelmente, descendente da espécie silvestre *Lactuca serriola*, sendo que a alface do tipo romana é uma cultura domesticada no Mediterrâneo desde, pelo menos, 2500 a.C. (Almeida, 2013). As alfaces de repolho, hoje tão populares, surgiram muito mais tarde, tendo sido descritas pela primeira vez em 1543 por L. Fuchs¹ (Gardé e Gardé, 1981).

A alface é, principalmente, consumida crua, em saladas, embora também possa ser cozinhada em sopas ou esparregado. No Egipto é comum a extração do óleo comestível das sementes da planta (Gardé e Gardé, 1981). A planta contém 94,8% de água, 1,2% de proteínas, 0,2% de gorduras e 2,9% de hidratos de carbono e em cru apresenta elevadas doses de vitaminas A, B, B2, C e E, assim como minerais (Tavares, 1988), no entanto, o conteúdo em vitaminas depende da cor das folhas, uma vez que as folhas esbranquiçadas do interior do repolho são menos nutritivas do que as folhas exteriores (Almeida, 2013).

A planta possui algumas propriedades medicinais, verificando-se em maior grau na *Lactuca virosa*, devido à presença de lactonas sesquiterpénicas que possuem ação sedativa ou calmante, antiespasmódica (previne espasmos nos estomago, intestino e/ou bexiga) e béquica (acalma a tosse e irritações na faringe) (Almeida, 2013).

A alface é uma espécie muito polimórfica, com um grande número de variedades, e, portanto, a escolha da cultivar depende de vários fatores, nomeadamente: época do ano em que se pretende fazer a cultura; o local e respetivo clima e; o gosto e preferências de mercado. Atualmente, a cada tipo de cultivar da planta pode-se fazer

¹ Leonhart Fuchs foi um médico alemão e escreveu “Kräuterbuch”, que significa “livro das ervas”, sendo, por isso, uma das figuras atualmente considerada como patriarca da botânica (Fonte: Wikipédia).

corresponder uma variedade botânica de *L. sativa*, descritas por vários autores e de acordo com a legislação em vigor. A classificação das cultivares depende, no entanto, do seu tipo varietal, das características das folhas, aptidão para formar repolho, adaptação à época cultural e ao sistema de cultura, suscetibilidade a doenças e pragas (Almeida, 2013).

1.1.2. Morfologia e ciclos

O sistema radicular da alface é apumado, pouco ramificado e algo superficial. A quantidade de solo explorado depende do modo de instalação da cultura, sendo que é maior quando é por sementeira direta (60 cm) e menor quando é por transplantação (Almeida, 2013). Normalmente, a maior parte das raízes desenvolve-se até 15-20 cm, podendo ser menor, se for bem regado, e maior, se desenvolvidas em estufa (Lopes e Simões, 2006).

A parte aérea é muito variada, consoante as variedades, sendo que as folhas podem ser lisas ou frisadas (ou crespas, como é por vezes descrita) e verdes ou vermelhas, quando possuem antocianinas, um pigmento que lhes confere a cor (Almeida, 2013).

Os frutos, agronomicamente apelidados por sementes, são aquénios, de 3 a 4 mm de comprimento, e têm grande variabilidade quanto à forma e cor (Gardé e Gardé, 1981). Os mesmos autores referem que os aquénios, se preservados em condições ótimas, podem ser viáveis durante 3 a 5 anos.

Durante as fases de crescimento vegetativo, as folhas encontram-se dispostas em roseta e vão-se alargando com o crescimento da cultura, enquanto que no estado reprodutivo, o caule alonga e produz uma haste floral ramificada. A floração ocorre por picos e durante um período de 50 a 70 dias, sendo que os aquénios maturam passado 12 a 17 dias.

Os ciclos vegetativo e cultural não são equivalentes: o ciclo cultural depende da cultivar, do local e da época de plantação, e engloba as fases do crescimento vegetativo; enquanto, o ciclo vegetativo da cultura abrange o ciclo cultural e ainda as fases reprodutivas, a começar no espigamento. O ciclo vegetativo da alface tem então, 5 fases: germinação e emergência, formação da roseta de folhas, formação do repolho, espigamento e floração e, finalmente, maturação dos aquénios (Almeida, 2013).

1.1.3. Produção da alface em Portugal e no mundo

De acordo com Almeida (2013), os principais produtores mundiais de alface estão concentrados nas zonas temperadas do Hemisfério Norte, devido às exigências climáticas da cultura. São eles a China, os Estados Unidos (principalmente na Califórnia), a Índia e a Espanha. Em 2017, no mundo, foram produzidos 27 milhões de toneladas de alface e chicória, em, aproximadamente 1 milhão de hectares (FAOSTAT, 10.10.2019). Existe alguma preferência regional, como por exemplo: nos EUA preferem a alface do tipo iceberg; em Espanha também prevalece este tipo de alface, apesar da tradição ser alface romana (Gardé e Gardé, 1981); em França predominam os tipos batávia europeia e bola de manteiga; já em Itália, predomina a alface romana (Almeida, 2013).

Dentro da Europa, que representa 11,4% da produção mundial de alface, 80% da produção está concentrada entre Espanha, que é o maior produtor, seguido da Itália, Alemanha e França, com Portugal a ocupar o 9º lugar (FAOSTAT, 10.10.2019).

Em Portugal, em 2018, a alface foi a 7ª cultura com maior produção a nível nacional e a 5ª com maior área cultivada (Quadro 1) (INE, 2019). As áreas com maior representatividade são as que se encontram perto dos centros populacionais do litoral, nomeadamente o Oeste, Entre-Douro-e-Minho e Beira Litoral (Almeida, 2013).

Quadro 1 - Superfície cultivada e produção da cultura da alface nos anos 2016, 2017 e 2018 em Portugal, comparadas com o valor total no setor das hortícolas (INE, 2019)

	Superfície (ha)			Superfície total de hortícolas (ha)	Produção (t)			Produção total de hortícolas (1000 t)
	2016	2017	2018	2018	2016	2017	2018	2018
Alface	2181	2284	1934	33660	51988	56345	45219	926,9

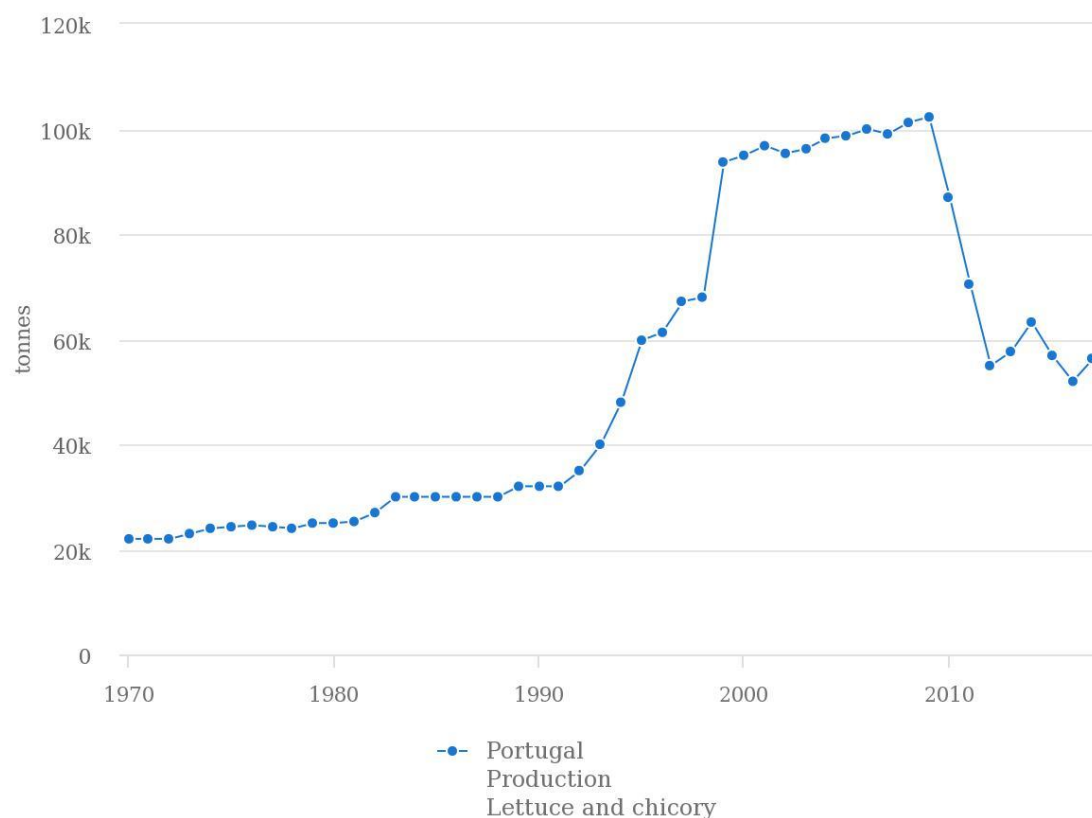


Figura 1 - Histórico da produção de alface e chicória em Portugal entre 1970 e 2017 (Fonte: FAOSTAT, acedido a 26.7.2019).

Podemos afirmar que a produção da alface (e chicória) em Portugal diminuiu no ano passado, como tem vindo a acontecer desde 2009 (Figura 1), apesar de a produção mundial aumentar.

A alface é uma cultura bastante perecível e sensível ao manuseamento e, por isso, as suas trocas comerciais tendem a ser maioritariamente intracontinentais, sendo bastante reduzidas a níveis internacionais (Almeida, 2013). O mesmo autor refere que, no entanto, existem algumas cultivares que apresentam maior resistência ao transporte, como as alfaces batávias frisadas e iceberg.

Em Portugal e para 2018, a exportação da alface apenas correspondeu a 3% das exportações totais de produtos hortícolas, plantas, raízes e tubérculos, comestíveis; contudo, relativamente à balança comercial da cultura (Quadro 2), foi bastante positiva, com um ganho de mais de 2 milhões de euros (INE, 2019).

Quadro 2 - Importações e exportações da alface e da chicória, em 2018, e o preço anual no produtor, nos anos 2016, 2017 e 2018 (Fonte: INE, 2019).

	Importações				Exportações			
	2017		2018		2017		2018	
	t	1000 €	t	1000 €	T	1000 €	t	1000 €
Alface e chicória	5866	5445	8156	7634	7379	11299	6364	9753
Preços anuais no produtor - €/100 kg								
Alface	2016		2017		2018			
	58,12		42,42		60,68			

1.1.4. Produção e fatores de qualidade

A alface, dentro das rotações, como o seu ciclo cultural é curto, é normalmente utilizada como cultura intercalar. Devido aos riscos fitossanitários, não se deve instalar alface a seguir a uma cultura de alface, chicória ou escarola (Almeida, 2013). A cultura, consoante as variedades, pode ser realizada durante todo o ano, em estufa e ao ar livre. Almeida (2013) refere que, normalmente, em estufa, a plantação ocorre preferencialmente de setembro a abril, ou de outubro a dezembro (plantações de Outono/Inverno), sendo que ao ar livre, ocorre de março a julho (plantações de Primavera/Verão).

Relativamente à implementação da cultura, pode ser por sementeira direta ou por transplantação, sendo que, em estufa, é sempre instalada com recurso à segunda opção, permitindo reduzir o ciclo cultural em 2 a 3 semanas em relação à sementeira direta (Almeida, 2013).

A duração do ciclo cultural depende da cultivar e da época, sendo que, na época de Primavera/Verão, dura 45 a 60 dias, enquanto, na época de Outono/Inverno, dura 60 a 90 dias; a colheita, na época fria, pode ser até o 75º dia após a sementeira, pelo que, na época quente, pode-se prolongar até 120 dias após a sementeira (Lopes e Simões, 2006).

Quadro 3 - Sugestão de plantação e colheita, tendo em conta a época e modo de produção (Fonte: Lopes e Simões, 2006)

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ag	Set	Out	Nov	Dez
Estufa												
Ar livre – Outono												
Ar livre-Primavera												
Plantação												
Colheita												

Em termos de rendimento, ao ar livre, é da ordem das 20-30 t/ha para variedades de repolho, sendo ligeiramente superior para as variedades romanas. Em estufa, o rendimento pode variar entre as 25 e as 35 t/ha (Tavares, 1988).

Segundo um documento da Direção-Geral de Proteção das Culturas (Lopes e Simões, 2006), as operações agrícolas determinantes para uma boa produção da cultura são as seguintes: preparação do terreno, estabelecimento de rotações, definição de densidades de sementeira ou plantação, sistemas de produção, fertilização e rega.

A plantação é realizada quando as plantas mostram 4 a 5 folhas verdadeiras, deixando o colo da planta 1 a 2 cm acima do solo. Imediatamente a seguir à plantação, deverá efetuar-se uma ou mais regas, sem encharcar o solo, de modo a aconchegar bem a planta à terra e atenuar a crise de transplantação (Lopes e Simões, 2006).

Relativamente a alguns cuidados culturais, Lopes e Simões (2006), referem a importância de sanchas, mondas e desbastes, assim como eliminação das infestantes. As amontoas são também relevantes, uma vez que melhoram a sustentação das plantas e a redução da perda de água no solo.

A rega é um fator bastante crítico para a produção, uma vez que a alface é pouco resistente à seca, devido ao fraco desenvolvimento do sistema radicular, característica que se agrava em climas quentes e ventosos. Na gestão da rega, é importante controlar a qualidade da água pois o excesso de sais é prejudicial; a frequência e a oportunidade de rega são também relevantes, dependendo da época do ano e do tipo de solo, assim como o modo de aplicação (Lopes e Simões, 2006). As mesmas autoras aconselham que, na cultura de Primavera/Verão, a frequência de rega seja aumentada para evitar o espigamento e que, nos primeiros dias após transplante, se regue por aspersão, de modo a evitar o aparecimento de problemas fitossanitários. No entanto, durante a formação da bola, a rega por aspersão aumenta a possibilidade do desenvolvimento de fungos patogénicos e, por isso, recomenda-se rega gota-a-gota.

A colheita é feita manualmente, normalmente, nas horas mais frescas do dia para evitar a perda da turgescência das folhas, através de um corte no caule da planta, ao nível da superfície do solo, e eliminando as folhas basais mais velhas. Varennes

(2003), refere que deve ser ao fim da tarde, de modo a diminuir a acumulação de nitratos, visto haver menor intensidade luminosa (menos fotossíntese) e a capacidade de redução de nitratos é menor. Este fenómeno também pode ocorrer nas folhas já completamente alargadas, uma vez que a sua capacidade redutora é mais baixa.

As alfaces são, depois, acondicionadas por calibres e colocadas em câmaras frigoríficas, de modo a garantir o maior tempo de vida de prateleira do produto (Almeida, 2013). O mesmo autor salienta que as alfaces do tipo romana e de corte tendem a ter uma vida pós-colheita mais curta do que as de repolho.

Uma alface de qualidade comercial deve ser inteira, sã, de aspeto fresco, limpo, sem folhas sujas; não pode estar espigada, túrgidas ou com humidade e tem de ser isenta de odores estranhos (Lopes e Simões, 2006). Santos (2016) refere que, para isso, todo o processo produtivo, desde a obtenção da matéria-prima até à prateleira do supermercado, deve ser realizado segundo as normas de segurança e higiene, através da avaliação de qualidade em todas as etapas da cadeia.

Os consumidores começam a ganhar interesse sobre a segurança dos alimentos, não só para saúde humana, como para o ambiente, abrindo portas para a produção biológica de produtos alimentares. Em termos da qualidade do produto, proveniente da produção biológica, ainda falta muita informação, nem ainda existe consenso na comunidade científica, mas, segundo a revisão de Santos (2016), um produto biológico apresenta uma composição mais diversa, rica em minerais, aminoácidos e proteínas, proporcionando uma alimentação mais adequada para o consumidor. A autora refere que as alfaces, fertilizadas com estrume animal, apresentam maiores teores de aminoácidos, hidratos de carbono e ácidos orgânicos.

1.1.5. Exigências edafo-climáticas

A alface adapta-se bem à maioria dos climas e a diferentes épocas do ano, devido às diversas variedades existentes. Frisa-se a importância da escolha adequada da variedade, adaptada às características climáticas do local, como o comprimento do dia, a insolação, a temperatura e entre outros, para a produtividade ótima da cultura e para a minimização de recursos utilizados (Lopes e Simões, 2006).

A planta prefere solos com textura franco-arenosa, ricos em matéria orgânica (de teor entre 2 a 4%), profundidade de 40 a 50 cm, pH entre os 6,5 e 7,2 e, como é moderadamente sensível à salinidade, principalmente na fase de plântula, prefere solos

com condutividade elétrica inferior a 0,4 dS/m² (Lopes e Simões, 2006), ou seja, solos sem efeitos salinos. Em solos muito salinos, as alfaces são abertas e escuras.

Tavares (1988) refere que a camada superficial do solo deve ser bem drenada, precisamente devido ao reduzido sistema radicular da planta. Caso os solos sejam de textura ligeira (arenosos) e quentes, o autor recomenda que deverão ser destinados às variedades de Inverno.

A alface tolera condições de baixa luminosidade, mas precisa de mais de 10h de luz para um desenvolvimento adequado (Lopes e Simões, 2006). As mesmas autoras aconselham climas temperados e, quando a alface é produzida em estufa, prefere temperaturas entre os 8 e 12°C e humidade relativa entre os 60 e 70%; e desaconselham zonas com ocorrência de geadas e zonas de climas extremos (Quadro 4). Em climas muito frios e húmidos, a alface tem um desenvolvimento lento e fica uma planta mais pequena, e em climas muito quentes, ocorre espigamento precoce e a qualidade da alface é prejudicada, uma vez que endurece, adquire um gosto amargo e o repolho fica pouco compacto.

A luminosidade e a temperatura são fatores decisivos na produção da alface, com ênfase na temperatura, sendo que as altas temperaturas e fotoperíodos longos favorecem a entrada na fase reprodutiva (Almeida, 2013). No Quadro 4 estão descritos alguns parâmetros das preferências edafo-climáticas da cultura da alface.

² Conforme descrito por Lopes e Simões (2006), este valor é determinado no extrato aquoso 1:2 (solo/água).

Quadro 4 – Quadro resumo de alguns parâmetros das preferências edafo-climáticas da alface (Almeida, 2013).

Parâmetros climáticos (°C)		
<i>Temperatura germinação</i>	Mínima	2-5
	Ótima	15-25
	Máxima	30
Temperatura média mensal ótima		15-20
<i>Fase de produção de folhas</i>	Dia	12-15
	Noite	10-12
<i>Fase de formação do repolho</i>	Dia	10-12
	Noite	2-6
Temperatura do solo ótima		13-15
Parâmetros edáficos		
<i>Tolerância à salinidade</i>		Moderada
<i>Nível crítico de salinidade</i>		1,3 dS.m ⁻¹ ³
<i>Intervalo ótimo de pH</i>		6,5-7,2
<i>Tolerância à acidez</i>		Reduzida

Podem surgir acidentes fisiológicos, resultantes de condições desfavoráveis à cultura, sendo que os mais relevantes são a necrose marginal, também conhecido como ‘tipburn’, e o espigamento precoce. O primeiro consiste, como o nome indica, na necrose marginal das folhas jovens e interiores da planta, consequente de uma reduzida concentração de cálcio no tecido da planta, provocado por condições que dificultam a sua absorção ou translocação, como baixas temperaturas do solo (abaixo de 7 °C), salinidade e elevada humidade relativa do ar. Este acidente é favorecido por temperaturas do ar elevadas, excesso de adubação e elevada intensidade luminosa (Almeida, 2013). O segundo acidente ocorre quando as plantas são submetidas a temperaturas elevadas, acima dos 33 °C, sendo favorecido por fotoperíodos longos e por stress hídrico (Almeida, 2013), em que o repolho pode parecer normal, no entanto, o seu interior encontra-se alongado.

1.1.6. Nutrição vegetal

Os nutrientes vegetais estão no solo, sob várias formas, podendo encontrar-se dissolvidos na solução do solo, adsorvidos na matriz do solo, na estrutura da matéria orgânica e precipitados em formas pouco solúveis. A solução do solo é a fonte da maior

³ No livro de Almeida (2013) os valores da condutividade elétrica referem-se ao extrato de saturação.

parte dos nutrientes para as plantas, no entanto, contém apenas uma pequena fração do conteúdo total de nutrientes presentes no solo (Varennnes, 2003). O que acontece é que os nutrientes em solução deslocam-se nos poros do solo e aproximam-se da superfície radicular. Este é o primeiro processo que limita o crescimento vegetal uma vez que o teor de nutrientes na planta depende do movimento destes e da taxa a que são absorvidos pelas células radiculares.

O mecanismo de aproximação dos nutrientes à raiz mais importante é por difusão, em que o movimento dos nutrientes é a favor de um gradiente de concentração. Mas pode também ser por fluxo em massa, ou interceção radicular (Varennnes, 2003).

As membranas celulares (de vários organelos - núcleo, cloroplastos e mitocôndrias - e entre o exterior e interior da célula) são as barreiras para a entrada de moléculas e iões e são constituídas por uma dupla camada lipídica, com cabeças hidrofílicas no exterior e caudas hidrofóbicas no interior. Os iões e a maior parte de moléculas não conseguem atravessar a parte lipídica das membranas, sendo que a sua passagem é através “das proteínas de transporte que estão embebidas na membrana” (Varennnes, 2003). O transporte descrito pode, ou não, gastar energia, se for transporte ativo ou passivo, respetivamente. O cálcio (Ca) é uma importante componente das membranas, estabilizando-as. Devido a este papel estabilizador, um nível adequado de Ca estimula a absorção de catiões e aniões (Varennnes, 2003). A mesma autora refere, ainda, que o magnésio (Mg) é de extrema importância, uma vez que faz a ligação entre ATP e a enzima, sendo fundamental para a atividade biológica destas enzimas.

A matéria orgânica (MO) do solo é constituída por resíduos de plantas e outros seres vivos, em vários estádios de decomposição; 60 a 80% da MO é húmus, que é a fração com matéria bem decomposta e estável, e é nesta que residem as características coloidais da MO, superiores à da argila (Varennnes, 2003). Ambos são os coloides do solo mais importantes, que são partículas com superfície específica muito elevada (Varennnes, 2003; LQARS, 2006), com cargas elétricas negativas à sua volta, que lhes dá a capacidade de permuta e aglomeração de iões (neste caso, refere-se adsorção). Ao conjunto deste sistema de coloides e iões dá-se o nome de complexo de troca do solo; a capacidade de troca catiónica é a capacidade máxima do solo em adsorver catiões, e é maior quando os teores de MO e argila são elevados (LQARS, 2006). Esta permuta de iões ocorre naturalmente e permanentemente, equilibrando os iões que estão adsorvidos nos coloides com os que estão livres na solução do solo (Varennnes, 2003).

As plantas, como são foto-autotróficas, “são capazes de sintetizar todas as moléculas orgânicas de que necessitam a partir da água, do dióxido de carbono atmosférico e de elementos minerais, utilizado a radiação solar como energia”

(Varennnes, 2003). A mesma autora elucida: os elementos essenciais são os elementos que desempenham funções específicas na planta, estando diretamente envolvidas no metabolismo da planta, porque fazem parte de uma molécula orgânica ou porque são necessários para alguma etapa do metabolismo, e sem os quais, as plantas não conseguem completar alguma etapa do seu ciclo. Estes elementos são ainda divididos em macro e micronutrientes. Os macronutrientes são C, H, O (a disponibilidade destes nutrientes não pode ser conferida através de fertilização), N, P, K (principais) e S, Ca, Mg (secundários). Os principais, são-no, pois são os que mais frequentemente limitam o crescimento vegetal, enquanto que os secundários, são assim chamados pois são abundantes na maior parte dos solos e são necessários em quantidades menores. Os micronutrientes são cátions (Fe, Mn, Zn, Cu e Ni) ou aniões (Cl, B, Mo).

Existem ainda os elementos benéficos, por exemplo o sódio (Na), que são aqueles que estimulam o desenvolvimento da planta, mas não são essenciais (podem ser essenciais, mas para apenas algumas espécies) (Varennnes, 2003).

Uma preocupação da aplicação de compostos orgânicos é a acumulação de metais pesados, uma vez que a presença destes metais, acima de uma determinada concentração, pode tornar-se tóxica “para as plantas, os animais e o próprio Homem” (LQARS, 2006). Tchounwou (2012) menciona que os metais pesados são definidos como elementos metálicos que apresentam uma densidade relativamente elevada, comparando com a água. O mesmo autor refere que estes nutrientes, apesar de tóxicos se em concentrações elevadas, são também essenciais para algumas plantas. São eles: cobalto (Co), Cu, crómio (Cr), Fe, Mg, Mn, Mo, níquel (Ni), selénio (Se) e Zn.

Dos nutrientes que se podem veicular através de fertilização, destacam-se os macronutrientes principais:

O **azoto (N)** - é dos macronutrientes cujo movimento preferencial é por fluxo de massa, mas o movimento por difusão também é importante. É maioritariamente absorvido pelas raízes, mas também pode ser absorvido através da parte aérea da planta, sendo assimilado na forma gasosa, como amoníaco (NH_3) e dióxido de azoto (NO_2) (Varennnes, 2003).

O azoto é o elemento que mais frequentemente limita a produção da cultura e é tão importante na planta por fazer parte da estrutura de várias componentes fundamentais para o metabolismo da planta, nomeadamente, da clorofila, das proteínas, das co-enzimas, dos ácidos nucleicos e de muitos outros compostos azotados importantes (Rodrigues e Coutinho, 2000; Varennnes, 2003; Weil, 2015). Uma vez que é

fundamental para o processo da fotossíntese, este nutriente tem um grande impacto no desenvolvimento e produtividade da cultura (Weil, 2015).

O nutriente fica mais móvel na sua forma mineral, nomeadamente, na forma de nitrato (NO_3^-), sendo esta a forma preferencialmente absorvida pela planta. A outra forma mineral é a de amónio (NH_4^+). Estas duas formas existem no solo, ou porque foram aplicados através de fertilizantes sintéticos, ou porque os microrganismos converteram a forma orgânica em mineral. A forma mineral, no caso do amónio, está ligada aos colóides do solo, e, no caso do nitrato, está livre para ser lixiviada ou assimilada. O ião amónio é tóxico para as plantas quando é aplicado sozinho, no entanto, quando a aplicação é combinada com o ião nitrato, aumenta fortemente o crescimento, ainda mais do quando se fornece apenas o ião nitrato (Weil, 2015).

O azoto na forma orgânica, não é assimilável, encontrando-se intrinsecamente ligado à matéria orgânica do solo, constituindo quase o N total do solo (entre 95 e 98%) (Varennnes, 2003; LQARS, 2006). A mineralização de N depende de vários fatores, como, o teor de MO do solo e a sua relação C/N, a temperatura, o teor de humidade, o pH, a época do ano e a duração do ciclo cultural, etc.

A assimilação de N envolve várias reações bioquímicas, no caso do nitrato, as reações começam no citoplasma, seguida de redução para a forma amónio, sendo esta a última forma mineral, antes de ser convertida para glutamato (forma orgânica), para formar outros aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (Weil, 2015).

A deficiência de N origina o amarelecimento das folhas, indicando perdas na clorofila e proteínas (Weil, 2015) (primeiros sintomas nas folhas mais velhas, devido à remobilização de N); e em excesso, pode originar situações de desequilíbrios nutritivos na planta, assim como o aumento de suscetibilidade a pragas, atrasos na maturação e pior qualidade de produto (Rodrigues e Coutinho, 2000). Segundo os mesmos autores, este nutriente afeta fortemente o desenvolvimento radicular, sendo que a expansão das raízes é aumentada com níveis adequadas no macronutriente, enquanto o excesso de N prejudica a expansão radicular, afetando o crescimento da planta, uma vez que a absorção de água e nutrientes é menor (Rodrigues e Coutinho, 2000).

Segundo Varennnes (2003), o teor de N necessário para o desenvolvimento ótimo de uma cultura varia, na generalidade, entre 20 e 50 g de N por kg de matéria seca da parte aérea.

O azoto influencia a assimilação de outros nutrientes na planta. Weil (2015) refere que, quando o ião amónio é dominante, a absorção de Ca, Mg e, em alguns casos, K, é suprimida; pelo contrário, está reportado o aumento de Zn, Fe e outros micronutrientes com o aumento de amónio absorvido (devido à acidificação provocada

da absorção de amónio). O aumento de Mn, Cu e B também pode ocorrer pela mesma razão.

O fósforo (P) – este elemento movimenta-se no solo por difusão, e é absorvido, pelas plantas, na forma inorgânica, através do ião dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) ou do ião hidrogenofosfato (HPO_4^-), sendo que a primeira é mais solúvel e absorvida mais rapidamente pela planta. O equilíbrio entre estas duas formas vai depender do pH, em solos ácidos, predomina o ião dihidrogenofosfato e, em solos alcalinos, predomina o ião hidrogenofosfato (Varenes, 2003). Portanto, a determinação do P assimilável é bastante complexa e, além de depender do pH do solo, depende também da sua temperatura, da humidade, atividade microbiana, etc.

Uma porção do P absorvido é convertido em formas orgânicas. Estas formas não solúveis, não permitem a lixiviação do nutriente, e contribuem para o aumento das reservas do solo (Varenes, 2003; LQARS, 2006). Por causa disso, hoje, muitas terras em Portugal apresentam níveis altos e muito altos de P no solo, no entanto, estão indisponíveis para a planta (LQARS, 2006).

É o segundo elemento a limitar o desenvolvimento vegetal, uma vez que faz parte da estrutura de ácidos nucleicos e fosfolípidos (membranas celulares) e desempenha um papel determinante nas transferências de energia e ainda como fonte de energia de várias reações químicas, essenciais para o metabolismo das plantas (Varenes, 2003). Ainda segundo a autora, o transporte do nutriente diminui com baixas temperaturas e falta de água, conduzindo a situações de carência, que levam ao crescimento reduzido da parte aérea, ao atraso da floração e ainda afeta a formação de sementes. Contrariamente, o excesso de P aumenta a razão parte aérea:raiz, uma vez que o desenvolvimento da parte aérea é favorecido em prol do crescimento da raiz.

O potássio (K) – existe abundantemente no solo, visto que é constituinte de muitos minerais do solo, sendo que, nesta forma o nutriente não é assimilável, constituindo, assim, a reserva de K no solo. Em mais pequena quantidade, o K assimilável existe adsorvido no complexo de troca ou dissolvido na solução do solo. Esta última forma, é a que existe em menor quantidade (LQARS, 2006). Este elemento não é convertido em formas orgânicas (Weil, 2015).

O potássio entra nas células na forma iónica (K^+) e é muito móvel, sendo que a sua absorção é muito rápida, movimentando-se no solo através da difusão. Contudo, em solos muito férteis, prevalece o movimento por fluxo de massa (Varenes, 2013). Este mesmo autor, refere que este catião é o mais abundante na planta e é um importante regulador do potencial osmótico dos tecidos, influenciando o transporte de

glúcidos, iões e moléculas, na planta e a conformação das enzimas, sendo, por isso, extremamente importante. Este elemento também regula a abertura e fecho dos estomas, originando sensibilidade ao stress hídrico, quando em quantidades insuficientes. Todas estas funcionalidades conferem-lhe uma grande importância em termos quantitativos (Varennnes, 2003).

Doses elevadas de K podem conduzir a desequilíbrios com outros nutrientes, nomeadamente com o magnésio. Podem, simultaneamente, gerar situações de consumo de luxo, em que a planta consome mais do que necessita, e como resultado, há a perda de investimento (relativo à fertilização), uma vez que este consumo de luxo não gera melhores produções (Varennnes, 2003; LQARS, 2006). A deficiência em K aumenta a suscetibilidade ao ataque por fungos e bactérias (Varennnes, 2003). Outros sintomas de deficiência de K são a inibição do crescimento e folhas cloróticas ou necróticas, principalmente nas margens (Weil, 2015).

A absorção de potássio é inibida na presença de amónio; K em excesso, pode interromper a absorção de Ca e Mg (LQARS, 2006; Weil, 2015).

É, ainda, importante salientar a relevância da **matéria orgânica**, como agente de manutenção da fertilidade do solo, influenciando positivamente as suas propriedades químicas e físicas, sendo determinante para a qualidade e resiliência do solo (Varennnes, 2003).

Em termos físicos, a MO afeta positivamente a agregação das partículas do solo, contribuindo para uma melhor estrutura e aumento da porosidade, favorecendo a circulação da água e do ar e a entrada das raízes no solo, simultaneamente, aumentando a capacidade de retenção de água. Favorece, também, a drenagem do solo, diminuindo os riscos de erosão e, tendo em conta a cor escura da MO, aumenta a absorção da radiação solar, contribuindo para o aumento da temperatura do solo (beneficiando as plantas e os microrganismos) (Lopes, 2008).

Do ponto de vista químico do solo, a MO (propriedades do húmus) está associada ao aumento da capacidade de retenção dos nutrientes, diminuindo a sua lixiviação, e contribui para a estabilização do pH do solo (Lopes, 2008). A autora destaca que, sendo o carbono o principal constituinte da MO, a acumulação da matéria orgânica resulta num maior sequestro de carbono, diminuindo, ou equilibrando, as emissões de CO₂. Varennnes (2003) afirma que, à medida que sofre mineralização, a MO vai fornecer N, P e S e micronutrientes às plantas.

Por outro lado, a presença de MO no solo, tem um efeito bastante positivo na biologia do solo. A matéria orgânica reforça a atividade e a diversidade microbiana, aumentando o nível de enzimas do solo. Como consequência, é estimulada a

mineralização da matéria orgânica e, os organismos, ao consumirem a MO, vão libertando nutrientes no solo, na forma mineral (Lopes, 2008), estando associados à maior disponibilidade de nutrientes para as plantas, com efeitos diretos na produtividade da cultura. Estes microrganismos são responsáveis pela maior parte de reações químicas no solo, incorporando ou transformando os nutrientes aplicados (Varennnes, 2003).

Com a decomposição da MO, é também libertado energia e compostos carbonatados para os organismos heterotróficos (Varennnes, 2003). A mesma autora dá ênfase a estes microrganismos, sendo que eles são responsáveis por 30% do N mineralizado.

1.1.7. Fertilização da alface

A fertilidade do solo, de acordo com Loganathan (1987), é a capacidade do solo em fornecer às plantas os nutrientes essenciais, nas quantidades e proporções adequadas ao seu crescimento e desenvolvimento, na ausência de substâncias tóxicas que os possam inibir. O mesmo autor refere que, num solo fértil, a produção suportada pelo solo diminui rapidamente devido ao esgotamento da reserva de nutrientes do solo. Para manter a produtividade do solo, é necessária a aplicação frequente de nutrientes, através da fertilização.

A recomendação de fertilização é feita com base nas classes de fertilidade do solo e na produtividade estimada de uma dada cultura. Lopes e Simões (2006) referem, que em certos casos, também se consideram as análises da água de rega.

Para a classificação dos solos, é necessário a determinação do teor dos nutrientes presente no solo, através da realização de análises químicas; sendo que a produtividade estimada é estabelecida segundo as condições edafo-climáticas em que se desenvolve a cultura, juntamente com as práticas culturais (Lopes e Simões, 2006). Outras características químicas e físicas de interesse, para a gestão de fertilização, são o pH, a textura e teor de MO do solo.

A par da constituição química do solo, deve-se também ter em conta as necessidades culturais, de modo a que se adube apenas com as quantidades necessárias, e, assim, evitar riscos ambientais, como lixiviação de nutrientes e gastos desnecessários. Na cultura da alface, devido à sua alta produtividade e ciclo curto, é comum a aplicação excessiva de fertilizantes minerais. Silva (2013) refere que os custos da fertilização, na cultura da alface, podem ir dos 10 aos 35% dos custos fixos totais. A recomendação da fertilização também depende do sistema de produção, e.g., modo de

produção biológica, convencional, hidropônica, assim como da cultivar da alface, tendo em conta a diversidade varietal da planta (Silva e Silva, 2019).

Caso o pH do solo for inferior a 5,9, deve-se aplicar corretivos alcalinizantes (Lopes e Simões, 2006), tendo em conta que a alface prefere solos neutros. Se for necessário a correção de pH e o solo apresentar teores de Mg baixos, deve-se aplicar calcário magnésiano (Lopes e Simões, 2006). O grau de saturação de bases do solo, que está relacionado positivamente com o pH, deve ser superior a 80% (Silva e Silva, 2019).

A alface é “relativamente pouco exigente em nutrientes”, no entanto, como o crescimento é rápido e o desenvolvimento do sistema radicular fraco, estes devem estar facilmente disponíveis (Almeida, 2013). De acordo com as fontes consultadas, a cultura é sensível à deficiência de Ca, Mg e Boro (B).

Em solos com textura demasiado pesada são preferíveis adubações de P e K, mas não em excesso devido à sensibilidade de cultura ao excesso de sais no solo (Tavares, 1988). Em períodos de fraca luminosidade, Tavares (1988) aconselha uma fertilização rica em K.

Na aplicação de N, deve-se ter em atenção a sua mobilidade no solo, e por isso, deve-se aplicar de forma fracionada. No caso da alface, cerca de 2/3 da absorção total de N ocorre após a formação do repolho, sendo que no início do ciclo, a absorção é reduzida (Almeida, 2013). Como tal, pode-se colmatar 1/3 das suas necessidades culturas com aplicação de adubação em fundo, e o restante, fracionado em uma ou duas coberturas (Tavares, 1988), mas evitando aplicações tardias de N.

Quantidades mais elevadas de N devem ser aplicadas nas variedades mais produtivas, na produção de Primavera-Verão e caso os solos sejam pobres em MO (Lopes e Simões, 2006). Os mesmos autores ditam que se deve reduzir a dose total de N aplicado em 20%, no caso de cultura de Inverno, e 30 a 40%, caso se trate de uma segunda cultura de alface.

LQARS (2006) recomenda, para um solo medianamente fértil, entre 0 a 4 g de **N** m⁻², 10-15 g de **P** (P₂O₅) m⁻², 10-15 g de **K** (K₂O) m⁻², 3-4 g de **Mg** m⁻² e, ainda, 10 g de **B** m⁻². Relativamente a outros micronutrientes, a necessidade de aplicação destes depende dos resultados da análise foliar (Lopes e Simões, 2006).

Santos (2016), destaca que a alface, cultivada em modo de produção orgânico (ou biológico, conforme as bibliografias), apresenta ótimos resultados produtivos e nutritivos, com respostas positivas à adubação orgânica, e ainda apresenta teores reduzidos de nitrato. Não é possível, no entanto, confirmar se o mesmo acontece quando é aplicado o composto orgânico em estudo (derivado da digestão das larvas da mosca soldado negro) como fertilizante na alface.

Apesar de a implementação do modo de produção orgânico ser dispendiosa, o seu custo de manutenção é inferior ao mesmo da fertilização tradicional (Santos, 2016), tendo em conta que se diminuem os custos da importação/compra de fertilizantes sintéticos, enquanto, os compostos orgânicos podem ser produzidos na própria exploração, evitando custos de transporte e ainda se aproveitam os subprodutos das culturas/pecuária. Contudo, a aplicação de compostos orgânicos pode contaminar o solo com metais pesados, compostos orgânicos e/ou com microrganismos patogénicos (Lopes, 2008), por isso, antes de aplicar o composto orgânico, deve-se garantir, através de determinações analíticas, de que é seguro.

Silva e Silva (2019) refere que solos compactos e/ou encharcados, aumentam a suscetibilidade da planta a doenças, e estão associados a decréscimos de produção. Refere, ainda, que a cultura prefere solos com boa estrutura, bem arejados, húmidos e ricos em MO. Portanto, o acréscimo de MO ao solo é um excelente agente de melhoramento do solo e da produtividade das culturas, e de extrema relevância em Portugal, uma vez que temos solos com baixo teor de MO e com tendência para diminuir progressivamente, se não for reposta adequadamente (Fernandes, 2016). Lopes e Simões (2006) concordam e afirmam que se deve aplicar MO ao solo, em quantidades de 30 t/ha/ano, para se atingir e manter “um nível mínimo de 1% de MO nos primeiros 25 cm do perfil do solo”.

Como referência para a recomendação da fertilização e para o diagnóstico do estado nutritivo da alface, a seguir, no Quadro 5, apresentam-se os teores foliares considerados adequados para uma planta de alface saudável.

Quadro 5 - Valores foliares de referência de macro e micronutrientes para a cultura da alface (da folha intermédia completamente desenvolvida a meio do ciclo vegetativo) (Lopes e Simões (2006).

Nutriente	Unidade	Níveis foliares suficientes*
N	%	3,5-5,0
P		0,4-0,8
K		5,5-7,0
Ca		2,0-3,5
Mg		0,4-0,8
Fe	ppm	40-100
Mn		11-250
Zn		20-250
Cu		5-25
B		25-60

*Limites inferiores ou superiores aos descritos como níveis suficientes, correspondem a níveis insuficientes e suficientes, respetivamente.

Tendo em consideração que a adubação da cultura é estabelecida de acordo com a sua exigência nutricional, a seguir, no Quadro 6, encontram-se os valores de referência da exportação de alguns nutrientes pela cultura da alface.

Quadro 6 – Exportação total de nutrientes, pela parte aérea da planta, para os tipos bola de manteiga e batávia, tendo em conta a produtividade da alface (Almeida, 2013).

Produtividade t ha ⁻¹	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO
	kg ha ⁻¹				
34	63	25	137	17	5
42	80	40	170	40	10

1.2. Processos de valorização de subprodutos agrícolas

Os processos de reaproveitamento e valorização de resíduos ou subprodutos de natureza orgânica representam uma prática determinante na sustentabilidade dos sistemas agropecuários, no sentido em que retiram volumes imensos de resíduos orgânicos das explorações, para os transformar em produtos orgânicos, passíveis de colocar no solo, como fertilizante/adubo das culturas, com o objetivo de “fechar” o ciclo

produtivo, contribuindo para a economia circular, e aumentar a autossuficiência dos produtores.

1.2.1. Compostagem

A compostagem é o processo natural de decomposição de materiais orgânicos, através da ação de microrganismos, em condições controladas. É bastante atrativa, uma vez que é responsável pela transformação de resíduos orgânicos em importantes e valiosos compostos, ricos em matéria orgânica, que podem ser aplicados ao solo como fertilizantes. Os referidos resíduos podem ser os resíduos da produção de culturas, resíduos de origem animal, como estrumes ou chorumes, restos alimentares, resíduos municipais e outros resíduos industriais adequados (Misra *et al.*, 2003). O produto resultante da compostagem é um composto orgânico, rico em fibra, N e P, cuja eficiência em fornecer nutrientes ao solo e à planta depende de vários fatores, como a matéria-prima usada no processo e o tipo de compostagem (Alattar *et al.*, 2016). Lopes (2008) descreve, nos seus estudos, que o produto da compostagem é um compostado e é definido como um “material estável, higienizado e semelhante ao húmus, rico em matéria orgânica e isento de odores agressivos [...]”.

A **decomposição anaeróbica** ocorre na ausência ou em concentrações limitadas de oxigénio (O), com o auxílio de microrganismos anaeróbicos. Estes microrganismos produzem certos compostos, como o metano e ácidos orgânicos, que, na falta de O, se acumulam, contribuindo para o odor forte do composto e para alguma toxicidade. O processo ocorre a temperaturas relativamente baixas, permitindo a sobrevivência de infestantes e de agentes patogénicos, e é mais demorado do que o processo aeróbico. No entanto, tem as suas vantagens: é pouco exigente em mão-de-obra e são perdidos menos nutrientes durante o processo. Este método é também a base da produção de biogás e, de acordo com o protocolo de Quioto, permite diminuir as emissões de dióxido de carbono (Odlare *et al.*, 2011).

Já o **processo aeróbico**, ocorre na presença de O, via microrganismos aeróbicos. Primeiro atuam os organismos mesófilos, que se multiplicam rapidamente com os açúcares e os aminoácidos facilmente disponíveis na pilha de composto. Estes organismos produzem calor com o seu próprio mecanismo, até à temperatura a que cessam atividade. Seguidamente, alguns organismos termófilos (fungos e bactérias), continuam o processo e aumentam a temperatura da pilha para valores superiores a

65°C. Este pico de aquecimento é importante para destruir os agentes patogénicos e as sementes de infestantes. De seguida, a pilha de materiais orgânicos entra em fase de maturação, momento em que a temperatura começa a descer gradualmente. Durante esta fase, outros organismos termófilos (fungos) entram em ação, sendo responsáveis pela decomposição das paredes celulares dos resíduos, constituídas por celulose ou hemicelulose. Esta fase é importante pois vai garantir que o composto resultante esteja maturo e sem efeitos tóxicos. Eventualmente, a temperatura decresce e organismos mesófilos colonizam a pilha de composto. O resultado é um composto uniforme, de cor negra, com partículas de pequena dimensão, de textura semelhante à do solo, com maior quantidade de húmus, menor ratio de carbono para azoto (C:N), pH neutro e com alta capacidade de troca de nutrientes (Misra *et al.*, 2003).

Estes organismos conseguem quebrar as partículas da MO e produzem dióxido de carbono (CO₂), amónia, água, calor e húmus e têm a capacidade adicional de decompor outros compostos, como os ácidos orgânicos, que não eram decompostos no processo anaeróbico. Este processo gera mais calor e dessa forma, consegue decompor proteínas, gorduras e hidratos de carbono complexos. Por isso, a decomposição aeróbica é mais rápida (Misra *et al.*, 2003).

Comparando as duas formas de decomposição orgânica, afirma-se, consensualmente, que a compostagem aeróbica é um simples e rápido processo para estabilizar e reduzir materiais orgânicos, enquanto, o processo anaeróbico é mais eficiente energeticamente (Odlare *et al.*, 2011).

Em suma, para além da finalidade de produzir um composto orgânico, que beneficia a produção vegetal, a compostagem é, também, importante na produção de biogás e, ainda, na higienização, na estabilização, na redução do risco de contaminação ambiental e na redução do volume dos resíduos orgânicos (Lopes, 2008).

1.2.2. Vermicompostagem

A vermicompostagem é a compostagem de materiais orgânicos, conseguida através da degradação enzimática de materiais orgânicos, devido à passagem destes pelo sistema digestivo de minhocas, durante o qual, fragmentam os substratos da pilha do composto e melhoram a atividade microbiana e a taxa de decomposição do material, originando um efeito de humificação em que a MO, anteriormente instável, oxida e estabiliza (Atiyeh *et al.*, 2000).

Este produto final, o vermicomposto, tem características físicas semelhantes à

turfa, é constituído por partículas finas com grande porosidade e arejamento. Tem boa capacidade de drenagem e de retenção de água e grande aptidão para adsorção e retenção de nutrientes, uma vez que possui uma grande área de superfície específica. É também bastante nutritivo, uma vez que contém nutrientes facilmente disponíveis para as plantas (Atiyeh *et al.*, 2000). O mesmo autor sintetiza, referindo que esta técnica, relativamente à compostagem aeróbica, não inclui uma fase termofílica, mas sim a aplicação das tais minhocas e, portanto, diferem nas temperaturas atingidas, em que na compostagem predominam bactérias termófilas, com temperaturas mais altas, enquanto que na vermicompostagem, predominam bactérias e fungos mesófilos, ativos em temperaturas mais amenas. Estes últimos organismos são estimulados pelas minhocas.

As referidas minhocas promovem o crescimento de bactérias e actinomicetas no composto, 6 vezes superior ao encontrado em solo normal (Misra *et al.*, 2003). Os mesmos autores mencionam que, estas minhocas, conseguem consumir o equivalente ao seu peso corporal, por dia, ou seja, 1 kg de minhocas pode consumir 1 kg de resíduos por dia, e que podem ser encontrados cerca de 50 000 minhocas num volume de composto de cerca de 1,7 m³.

1.2.3. Utilização da mosca soldado negro na valorização dos subprodutos agrícolas e produção de compostos orgânicos

O processo usado para a produção do composto orgânico, que é objeto de estudo da presente tese, é muito semelhante à vermicompostagem, no entanto, os agentes decompositores são as larvas de dípteros, neste caso, a mosca soldado negro (MSN), *Hermetia illucens* L. Tal como na vermicompostagem, não existe uma fase termófila neste processo, mas uma segunda fase mesófila, que permite a degradação, mais lenta, de alguns compostos mais resistentes, como a lenhina (Bloukounan-Goubanal *et al.*, 2019).

O produto resultante da ação digestiva das larvas da MSN utilizado no ensaio descrito no capítulo 2, irá, ao longo da presente dissertação, ser referido como composto orgânico. Chamar-lhe vermicomposto seria incorreto, uma vez que a larva é um estado da mosca (Classe Insecta) e não um verme, por isso, o mais correto seria entomocomposto, no entanto, não existe ainda em Portugal legislação para este termo e, portanto, não pode ser empregue.

A ordem Díptera é a ordem de insetos mais frequentemente encontrada em materiais orgânicos em decomposição e, segundo Čičková *et al.* (2015), Lindner, em 1919, foi provavelmente o primeiro a propor o uso de moscas para a recuperação de

nutrientes a partir de resíduos orgânicos (excrementos humanos e animais). Desde então, têm sido muitos os investigadores a estudarem a viabilidade da introdução das larvas na gestão de resíduos, com o interesse que apresenta num conceito de economia circular.

A “economia circular” é definida como um sistema económico, que valoriza o conceito de restauração, em vez do conceito de fim de vida, e consiste na “mudança para o uso de energias renováveis, eliminação do uso de químicos tóxicos e eliminação de desperdícios” (EIP-Agri, 2019). Na mesma publicação é referido que, para implementação destes sistemas económicos é necessário o aperfeiçoamento de materiais, produtos e sistemas.

Esta é a verdadeira vantagem desta prática, pois a utilização da MSN na gestão de resíduos permite a circularidade na produção agrária, assim como na pecuária, uma vez que produzem os ditos compostos orgânicos e as próprias larvas podem, após tratadas, ser utilizadas para diversos fins (referidos no ponto 1.2.3.3), salientando-se aqui a alimentação, animal ou humana. Resolvendo, desta forma, dois problemas globais: a deficiência em proteína animal e a excesso de resíduos orgânicos; e ainda contribui para o uso mais sustentável e eficiente dos recursos naturais.

A criação em massa destas moscas é relativamente fácil e têm um ciclo de vida curto, com grandes taxas de reprodução (Pastor *et al.*, 2015), sendo bastante vantajosas. A MSN apresenta a vantagem de se manter afastada dos hábitos humanos, ao contrário da *Musca domestica* e, devido à densidade de larvas que a MSN produz, ainda tem a capacidade de reduzir a população da *M. domestica* em cerca de 94-100% (Sheppard *et al.*, 2002). Esta vantagem é particularmente importante em países em desenvolvimento, onde a gestão sanitária não é a melhor, e considerando que a *M. domestica* é um importante vetor de doenças (Diener *et al.*, 2011).

O trato gastrointestinal da larva da MSN (MSNL) pode ser dividido em 3 partes e todas podem hospedar diferentes comunidades de bactérias (Smet *et al.*, 2018). Quando comparadas, as enzimas do trato gastrointestinal da MSNL com as da larva de *M. domestica*, observou-se níveis de atividade superiores na primeira larva, assim como maior diversidade, demonstrando o grande potencial da MSN como agente de biocompostagem, conseguindo digerir uma grande diversidade de subprodutos orgânicos (Kim *et al.*, 2010). O mesmo autor menciona que 90% da digestão ocorre devido a enzimas no trato gastrointestinal, enquanto os restantes 10%, ocorrem devido às enzimas nas glândulas salivares.

Dentro dos materiais orgânicos que a MSNL consegue digerir, podem-se distinguir os subprodutos do cultivo de cereais e/ou hortícolas (Sheppard *et al.*, 2002),

resíduos de cozinha (Nana *et al.*, 2018), subprodutos da indústria de processamento do atum (Hakim *et al.*, 2017), excreta humana e animal (sendo estrume de porco o mais comum a ser estudado) (Liu *et al.*, 2008; Kováčik *et al.*, 2014), subprodutos resultantes da produção de biogás (Sprangers *et al.*, 2017) e resíduos urbanos (Morales e Wolff, 2009; Diener *et al.*, 2011). E, também, já foi documentada a presença da mosca em cadáveres em decomposição, constituindo uma boa ferramenta em casos forense (Tomberlin *et al.*, 2009; Martínez-Sanchez *et al.*, 2011).

A diversidade de substratos que a MSNL consegue digerir resolve vários problemas de gestão de resíduos, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, uma vez que ainda praticam lixeiras abertas e são pobres a gerir e reciclar o lixo (Banks *et al.*, 2014), originando graves problemas relacionados com a contaminação dos solos e aquíferos e ainda problemas higiénicos (Choi *et al.*, 2009). Para a criação de uma linha de montagem para o processamento de resíduos orgânicos, usando a MSN, não é necessário tecnologia muito avançada, sendo bastante vantajoso para países de baixo rendimento, uma vez que dependem de tecnologias simples e mão-de-obra não especializada. Deste modo, conseguir-se-ia reduzir os riscos higiénicos e ambientais, associados à gestão de resíduos (Dortmans *et al.*, 2017).

A escolha adequada da espécie da mosca para a realização da biodegradação de resíduos é um passo importante no aumento da eficiência do processo e depende de vários fatores, sendo os mais importantes: comportamento; taxa de inoculação; produção de larvas; duração do desenvolvimento da larva; presença natural no meio escolhido; estatuto, ou não, de peste; adaptabilidade para criação em massa em laboratório e; redução do volume dos resíduos (Pastor *et al.*, 2015). Os estudos destes autores descrevem diferentes espécies, criadas em diferentes meios orgânicos, e concluem que a MSN é um agente decompositor que consegue digerir qualquer forma de composto orgânico com resultados muito bons na redução de volume, assim como uma grande produção de larvas. Existem ainda outros candidatos, como, por exemplo, a aplicação de *M. domestica*, que conduz a boas reduções de volume, mas a sua produção de larvas é inferior à da MSN, a *Calliphoridae* e a *Sarcophagidae* não são tão boas a reduzir o volume do composto, mas são ótimas reprodutoras, com interesse para produção em larga-escala (Pastor *et al.*, 2015).

1.2.3.1. Hábitos e ciclo de vida da MSN

A mosca soldado negro (MSN), *Hermetia illucens*, descrita por Linnaeus em

1758, (em inglês, black soldier fly - BSF) é um díptero da família Stratiomyidae, originária da América do Sul e está presente na natureza nos trópicos e nos subtropicais entre as latitudes 40°S e 45°N (Dortmans *et al.*, 2017) e tem 4 fases de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e por fim adulto. A mosca não entra na lista de vetores de doenças e/ou microrganismos (Caruso *et al.*, 2013) e é, às vezes, confundida com uma vespa, tendo em conta que o tamanho é semelhante, no entanto a MSN adulta é preta (Figura 2) (Aggrey Jnr., 2017).



Figura 2 – Plano coronal da Mosca soldado negro. Fotografia retirada do site: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/217341?lg=en , acedido em 7/4/2020.

A MSN, se estiver fora do seu habitat natural, consegue fazer até 3 gerações por ano, desde o fim da Primavera até ao início de Outono, enquanto que dentro do habitat, consegue reproduzir-se o ano inteiro (Sheppard *et al.*, 2002). A mosca prefere climas quentes, sendo que quase toda a postura ocorre acima dos 26°C (Čičková *et al.*, 2015). Este díptero é muito resiliente, com uma alta taxa de sobrevivência, prolongando o seu ciclo de vida se não encontrar condições favoráveis, como alimentação em quantidade e qualidade adequadas (Barragan-Fonseca *et al.*, 2018).

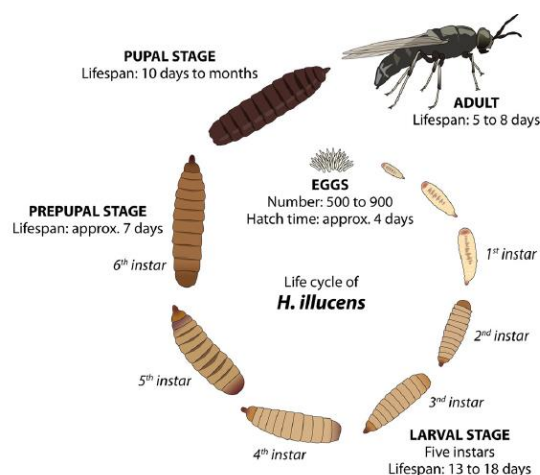


Figura 3 - Ciclo de vida da *Hermetia illucens*, segundo Smet *et al.* (2018).

A duração e outras características das diferentes fases do ciclo de vida da MSN dependem de vários parâmetros, como por exemplo, das condições edafo-climáticas e, portanto, os seus valores podem variar entre autores (Figura 3).

A fêmea põe cerca de 400 a 800 ovos de cor branco-leitosa, depositando-os em ranhuras ou fendas, para evitar a luz direta e manter humidade, e perto de uma fonte de alimento, de forma a possibilitar a alimentação da larva assim que esta nascer (Dortmans *et al.*, 2017). Os ovos demoram cerca de 3-4 dias a eclodir e, por essa razão, não devem ser colocados imediatamente no local de alimentação, sendo aconselhável esperar para o final da eclosão; as larvas, de coloração creme claro, nascem com um comprimento de poucos milímetros e no fim do seu período de desenvolvimento atingem os 2,5 cm (Sheppard *et al.*, 2002; Diener *et al.*, 2011).

A larva tem 6 instares, sendo que o último é o de pré-pupa e, se as condições forem favoráveis, duram 13-18 dias (Smet *et al.*, 2018). É apenas durante esta fase que se consegue alimentar, devido às partes bucais, e, portanto, tem de garantir que armazena as reservas suficientes para a passagem de larva para adulto, para o acasalamento e ainda para a postura dos ovos, no caso das fêmeas (Dortmans *et al.*, 2017).

A pré-pupa tem uma duração média de vida de uma semana (Smet *et al.*, 2018), e é neste estágio que ganha coloração acastanhada até preto escuro e sofre modificação nas partes bucais, substituindo a boca por um gancho, de modo a facilitar a saída da pupa do local onde se alimenta, para um local mais seco, onde irá terminar a sua metamorfose para imago (forma adulta), que pode demorar até 12 dias (DGAV, 2018). A mosca adulta começa logo a voar, 5 minutos depois de ter

saído da casca da pupa, e tem uma duração média de vida de 5-8 dias (Dortmans *et al.*, 2017; Smet *et al.*, 2018). Os machos juntam-se em locais lek⁴, acasalando ao fim de 2 dias, sendo que a fêmea morre após a postura (Sheppard *et al.*, 2002; Tomberlin *et al.*, 2009; Dortmans *et al.*, 2017). Durante o estado adulto, a mosca apenas bebe água (Tomberlin *et al.*, 2009) e não é grande voadora, permanecendo a maior parte do tempo pousada (Diener *et al.*, 2011; Čičková *et al.*, 2015).

Dortmans *et al.* (2017), referem, no seu guia de processamento de biowaste⁵, que a eclosão dos ovos tem uma taxa de sucesso de 70%, que a sobrevivência durante a fase larvar também é de 70% e que a emergência (de pupa para adulta) tem 80% de sucesso.

Um exemplo das condições de crescimento da MSN é o ensaio de Sheppard *et al.* (2002), onde se registou uma densidade de 2,5 larvas cm⁻² de superfície, com uma alimentação de 1-1,5 g dia⁻¹, sendo que, as moscas, para o acasalamento e postura, toleraram um grande intervalo de temperaturas, entre os 24 e os 40°C, e humidades entre 30 e 90% de humidade relativa. As larvas apreciam luminosidade, numa intensidade de 200 μmol m²s⁻¹.

1.2.3.2. O composto orgânico

Relativamente ao composto orgânico produzido, que é o ponto principal da presente tese, é rico em fibra, N e P, assim como outros nutrientes essenciais e, quando aplicado ao solo, aumenta o teor de N e P, o teor de MO e o pH, e ajuda a reduzir a erosão do solo (Lalander *et al.*, 2015; Alattar *et al.*, 2016; Dortmans *et al.*, 2017). Com ele, podemos substituir os fertilizantes sintéticos, que são dispendiosos e têm efeitos prejudiciais para o ambiente, como lixiviação de nitratos, escoamento superficial de P e N e eutrofização de ecossistemas aquáticos (Adesemoye e Kloepper, 2009).

A sua aplicação como corretivo orgânico tem a vantagens de aumentar o arejamento do solo (diminui a densidade aparente), permitindo, assim, a presença de microrganismos aeróbicos; é também responsável pelo aumento do sequestro de C orgânico e biodiversidade microbiana; além disso, afeta positivamente a qualidade e quantidade da produção (Bloukounon-Gloubalan *et al.*, 2019). Os mesmos autores referem que, para averiguar a qualidade de um composto como corretivo orgânico do solo, é essencial conhecer a sua razão carbono:azoto (C/N) e a razão amónio:nitrato

⁴ Um **lek** é uma agregação de machos que se juntam para entrar em exibições competitivas que podem convencer fêmeas visitantes que estão à procura de possíveis parceiros para copulação (fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Lek_mating, acedido a 15.1.2020)

⁵ No contexto que os autores pretendem, biowaste representa todos os resíduos biodegradáveis, não incluindo os têm alto teor de celulose, uma vez que a larva não os consegue digerir facilmente.

($\text{N-NH}_4^+/\text{NO}_3^-$).

Contudo, é necessário garantir a maturação e estabilização dos compostos orgânicos, antes de os aplicar ao solo. A aplicação de compostos instáveis ou imaturos ao solo pode causar danos nas culturas, pela competição do O, ou ainda causar toxicidade às plantas, devido à insuficiente degradação da MO (Lopes, 2008).

A composição do composto orgânico depende do meio de crescimento das larvas, afetando, conseqüentemente, o desenvolvimento da planta (Zahn, 2017), por exemplo, Kagata e Ohgushi (2012), nos seus ensaios, obtiveram um composto com maiores teores de N total, N amoniacal e N nítrico, quando as larvas foram alimentadas com plantas fertilizadas. Dentro dos estudos já realizados, relativamente à introdução da *H. illucens* na gestão de resíduos, as temáticas que receberam mais atenção foram os métodos para a criação da própria mosca, considerando os seus efeitos na “reciclagem” de resíduos orgânicos e a caracterização entomológica da MSN, visando uma qualquer finalidade (como as referidas no ponto 1.2.3.4.). Contudo, existe carência de informação sobre a qualidade do composto produzido pelas larvas da MSN, assim como quantidades e modo de aplicação como fertilizante orgânico. Daí a importância de novos estudos e novas experiências, relacionados com a uso deste composto como fertilizante em diversas culturas, de modo a viabilizar a adoção desta prática.

Ainda durante o processo de conversão, as larvas têm a capacidade de reduzir o volume do composto em 40% da sua matéria seca (Diener *et al.*, 2009a). Com a diminuição do volume do fertilizante, é possível reduzir os custos de transporte, tendo em conta a distância das explorações agrícolas às fontes nutricionais (Bloukounon-Goubalan *et al.*, 2019). Investigações pendentes indicam que as larvas se alimentam mais facilmente se os resíduos orgânicos já tiverem sofrido algum tipo de compostagem (Dortmans *et al.*, 2017). Os mesmos autores também referem que os substratos necessitam de estar bem húmidos, entre 60 a 90%, de modo a permitir a ingestão pela larva.

A larva também reduz a contagem de agentes patogénicos, como *Salmonella spp.* e vírus, diminuindo a transmissão de doenças entre animais e entre animais e pessoas (Lalander *et al.*, 2015; Dortmans *et al.*, 2017). São também responsáveis pela remoção de odores, uma vez que suprimem e restringem o desenvolvimento de bactérias (Diener *et al.*, 2011).

1.2.3.3. Outras finalidades

Para além do composto orgânico que elas produzem, está documentada a utilidade das larvas na alimentação animal e na produção de biodiesel, devido à acumulação de gordura e proteína, na forma de biomassa, durante a digestão (Lalander *et al.*, 2015). Os autores, na sua obra, obtiveram 11,8% de conversão em biomassa. Em média, a larva da MSN contém maiores concentrações de proteína e gordura, comparada com outras espécies de insetos comestíveis (Barragan-Fonseca *et al.*, 2018).

É na fase de pré-pupa que a extração de proteína e gordura são de interesse, contendo 31-35% de gordura e 36-48% de proteína na sua biomassa corporal (Sheppard *et al.*, 2002; Diener *et al.*, 2011; Dortmans *et al.*, 2017). A pré-pupa, além de esvaziar o seu trato digestivo, reduzindo o risco de transporte de patogénicos, também facilita a colheita/apanha das larvas, uma vez que apresenta um mecanismo de migração, que é a mudança da parte bucal (Diener *et al.*, 2009; Sprangers *et al.*, 2016).

A proteína é de grande qualidade (Smet *et al.*, 2018) e constitui um bom substituto de fontes proteicas usadas convencionalmente para a ração dos animais, e.g. cereais, farinha de peixe ou de soja, entre outros. Estes alimentos, atualmente produzidos em larga escala, contribuem para a produção de gases com efeito de estufa e usam grandes quantidades de energia fóssil e terra arável, principalmente em zonas tropicais, onde sobre exploram as florestas e conduzem a perdas de biodiversidade (Oonincx *et al.*, 2015; Sprangers *et al.*, 2016). Existe ainda outro fator para o desenvolvimento de substitutos da alimentação animal tradicional, sendo que este é económico, tendo em conta que as rações já contabilizam cerca de 60-70% do custo total de produção (FAO, 2013) e, por isso, a obtenção de rações provenientes de resíduos já existentes na exploração é fundamental e profícua.

As larvas são bastante palatáveis para galinhas poedeiras, conforme descrito por Wang e Shelomi (2017) e estão comprovadas como um bom substituto parcial (taxa de substituição da ração convencional de 50%) em trutas-arco-íris (Stamer *et al.*, 2014). Machado (2019), tendo experimentado diferentes taxas de substituição dos alimentos convencionais por larvas de MSN (em frangos de carne), não obteve diferenças significativas entre os dois tipos de alimentação, independentemente da taxa de substituição, confirmando que as larvas podem ser uma fonte nutricional e sustentável na alimentação animal.

A gordura, passível de ser retirada da larva, pode ser usada para produção de biodiesel, não necessitando da adição de químicos poluentes, com uma taxa de transformação dos ácidos gordos livres em combustível, de 90%, de acordo com o ensaio de Wang *et al.* (2017). Os mesmos referem a importância do desenvolvimento de fontes de energia mais sustentáveis, económicas e eficientes, de modo a combater

a depleção de reservas fósseis, os preços elevados de combustível, os impactos ambientais (como a emissão de CO₂) e para garantir segurança energética. No entanto, ainda falta testarem a performance do biodiesel no motor.

Contudo, e em semelhança com a composição do composto resultante, a composição dos substratos fornecidos à larva da MSN (assim como outros fatores bióticos, como, por exemplo, a densidade larvar (Barragan-Fonseca *et al.*, 2018)), também afeta o tempo de desenvolvimento e a composição química do corpo da larva (Oonincx *et al.*, 2015). Nguyen *et al.* (2015) obtiveram pupas com maior teor proteico quando alimentadas com substratos de origem animal, ricos em proteína, do que quando alimentadas com subprodutos vegetais. Relativamente ao teor de gordura na composição da larva, é superior quando o substrato é rico em gordura e carboidratos, e inferior quando o substrato é pobre em gordura e rico em fibra (Nguyen *et al.*, 2015).

É, portanto, possível adequar o modo de produção das larvas, tendo em conta a finalidade da sua criação, quer seja para produzir proteína ou gordura. Deve-se, também, ter uma compreensão global do ciclo de vida e dos efeitos destes fatores bióticos e abióticos, para otimizar a produtividade da mosca e a sua qualidade nutritiva (Barragan-Fonseca *et al.*, 2018)

Um outro subproduto passível de obtenção é a quitina, formada por proteínas, lípidos e outros compostos, e presente na cutícula dos insetos (camada mais externa do exoesqueleto do inseto). O grande interesse comercial deve-se ao seu alto teor de N (6,9%, quando comparadas com celulose sintética - 1,25%), tornando a quitina um excelente agente quelante para produtos medicinais, de cosmética e ainda biotecnologia (Diener *et al.*, 2011; Smet *et al.*, 2018). O conteúdo de quitina na pré-pupa é de cerca de 87g kg⁻¹ de massa seca (Diener *et al.*, 2009b), sendo que está reportado que o seu conteúdo afeta negativamente a digestibilidade de nutrientes em alguns animais (Spranghers *et al.*, 2017). No entanto, a sua viabilidade ainda não foi confirmada, uma vez que a sua extração é complicada e dispendiosa (Diener *et al.*, 2011).

Falta, ainda, legislação relativo ao uso da mosca. A partir de julho de 2017, foi autorizado pela Comissão Europeia, a utilização da larva da MSN como ingrediente na alimentação em aquacultura e, espera-se que, em 2020, seja autorizada a sua utilização na alimentação de porcos e aves (Smet *et al.*, 2018). Os mesmos autores referem que, nos Estados Unidos da América, a larva inteira, desidratada, pode ser usada como

alimento para salmonídeos e, em Idaho, Indiana e Alasca, é permitido como alimento para todas as espécies.

1.2.3.4. *Modo de produção do composto*

Em resposta ao potencial da *H. illucens* e à abertura de novos mercados, uma vez que já foi autorizada a sua implementação na alimentação de alguns animais, muitas empresas de criação das moscas têm otimizado a sua produção (Smet *et al.*, 2018). Caruso *et al.* (2013) publicou um manual sobre a domesticação e produção da mosca soldado negro. O Instituto Federal da Suíça da Ciência e Tecnologia Aquática (Eawag) (Dortmans *et al.*, 2017) publicou um guia para o processamento de resíduos orgânicos usando a MSN. Em Portugal, a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), inserido no projeto Entovalor, publicou um “Manual de boas práticas para a Produção de insetos, o seu processamento e aplicação em alimentação animal” (DGAV, 2018).

A Entogreen®, a empresa que liderou o projeto que permitiu o desenvolvimento do trabalho que sustenta a presente dissertação (projeto EntoValor), vai abrir a sua primeira fábrica e entrará em laboração com capacidade para a biodigestão de 3000 toneladas de subprodutos por mês e uma produção estimada de 2600 toneladas de proteína, 500 toneladas de óleo e 9000 toneladas de fertilizante orgânico por ano (Informação divulgada no site da empresa, visualizado a 20.10.2020).

O processo, adaptado por aquela empresa, para a formulação do composto usado no ensaio experimental apresentado nesta tese, começa pelo acasalamento das moscas adultas, numa sala específica, durante 5 dias. Estas são depois conduzidas, através de sinais de atração, para um local indicado, onde irão realizar a postura dos ovos. Os ovos são recolhidos e inoculados numa ração específica para larvas juvenis, formulada pela empresa, onde permanecem, mais 5 dias, em incubação. São depois transferidas para tabuleiros com restos hortícolas (subprodutos da agroindústria), para se alimentarem, período durante o qual aumentam de tamanho, passando de poucos milímetros para 2,5 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, e ganham coloração creme. Esta última fase dura cerca de 15 dias.

Desses tabuleiros resultam dois produtos (separados por peneiração): as próprias larvas, que são utilizadas para alimentação animal (Figura 4), e a excreta (em inglês: *frass*) produzida por elas, o dito composto orgânico. O processo permite o encerramento do ciclo de produção agrícola, em que os resíduos orgânicos produzidos são matéria-prima valiosa que, depois de processados pela mosca,

podem ser utilizados na agricultura e na pecuária (Figura 5), contribuindo, desse modo, para uma economia circular, como já foi referido, com menores impactos no ambiente e evitando desperdícios.



Figura 5 - Exemplo de um lote de larvas desidratadas, produzidas nas instalações da Entogreen, e retirado do site da Entogreen: <https://www.entogreen.org/pt/entovalor/>

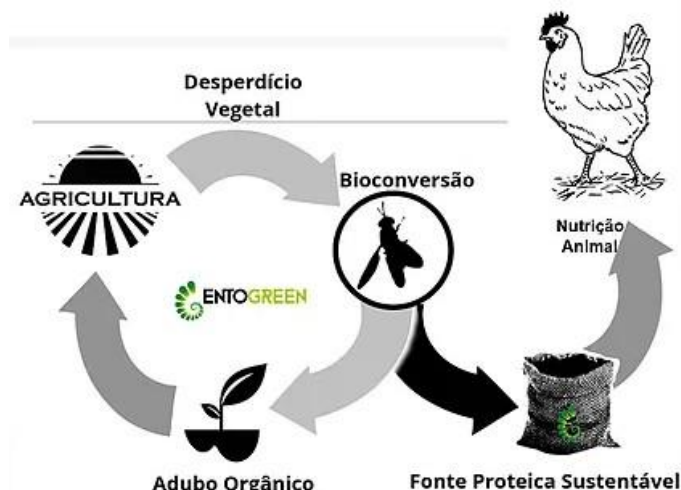


Figura 4 - Demonstração do processo realizado na obtenção do composto e como representa um exemplo de economia circular (retirado do site da Entogreen: <https://www.entogreen.org/pt/entovalor/>).

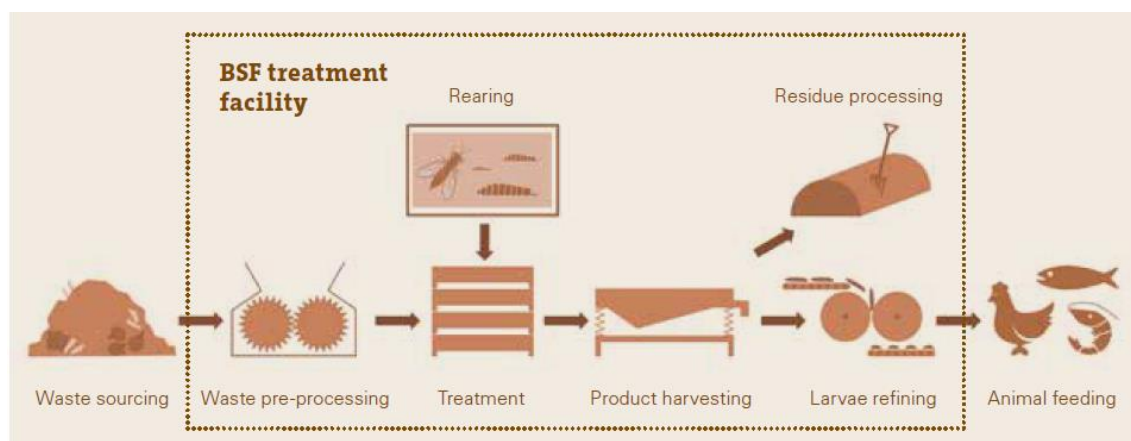


Figura 6 - As diferentes unidades de um sistema de tratamento de resíduos utilizando a MSN, sugerido por Eawag (Dortmans *et al.*, 2017).

1.3. Métodos para avaliar a influência do composto na planta e no solo

1.3.1. Análises químicas

Análises químicas referentes ao conteúdo em macro- e micronutrientes realizadas ao composto, ao solo e às plantas, permitem avaliar a sua composição (Lopes e Simões, 2006). Estas análises foram realizadas antes do ensaio, para o composto, o solo e as plantas (obtidas em viveiro) e no fim do ensaio, mas neste caso apenas ao solo e ao material vegetal, o que permitirá identificar algum efeito do composto, caso ele exista. Os métodos das análises estão discriminados no ponto 2 da presente tese.

1.3.2. Avaliação da actividade enzimática

Medir ou avaliar a qualidade do solo é uma apreciação complicada de fazer uma vez que os solos são intrinsecamente diferentes entre si (Bandick e Dick, 1999). É, então, sugerido o uso de enzimas como potenciais indicadores da qualidade do solo devido à sua relação com a biologia do solo, a sua fácil medição e a sua resposta rápida a mudanças no solo (Bandick e Dick, 1999). Segundo os autores, as enzimas são principalmente originadas pelos microrganismos do solo, mas podem também ter originaem nas plantas e nos animais. Tais enzimas são importantes catalisadores das reações químicas essenciais para o solo e são responsáveis pela decomposição e formação de MO, reciclagem de nutrientes e estabilização da estrutura do solo (Makoi e Ndakidemi, 2008). Os mesmos autores referem que os níveis de enzimas no solo variam consoante o conteúdo de MO, a composição dos organismos vivos e a intensidade das reações bioquímicas. Na presente tese, foram escolhidas as enzimas desidrogenase e β -glucosidase como indicadores da qualidade do solo e da atividade microbiana.

A desidrogenase existe como parte integral das células intactas no solo, sendo responsável pela oxidação de MO, através da transferência de eletrões e prótons de substratos para aceitadores (Makoi e Ndakidemi, 2008). Os mesmos autores mencionam que estes processos fazem parte das vias respiratórias dos microrganismos e, por isso, o nível da atividade da enzima permite concluir sobre o potencial do solo em suportar processos bioquímicos essenciais para a manutenção da fertilidade do solo, sendo um bom indicador da atividade oxidativa dos microrganismos do solo. Makoi e Ndakidemi (2008) referem ainda que os níveis enzimáticos da desidrogenase são mais elevados em solos saturados com água.

Em relação à β -glucosidase, esta catalisa a hidrólise e biodegradação de β -glicósidos presentes em resíduos vegetais em decomposição, sendo uma das quatro enzimas mais predominantes no solo (Alef e Nannipieri, 1995). Essa reação produz glucose, que constitui uma fonte carbônica de energia importante para a vida dos microrganismos do solo (Makoi e Ndakidemi, 2008). Esta enzima desempenha, assim, um papel fundamental no ciclo de carbono (Bandick e Dick, 1999) e constitui um bom indicador para a atividade biológica (já cessada), e da capacidade do solo em estabilizar a matéria orgânica.

2. Material e métodos

2.1. Ensaio experimental

O ensaio experimental decorreu de julho a setembro de 2019, com a duração de 43 dias (6 semanas e meia), nas estufas do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), em Oeiras. O local encontra-se a uma latitude de 38°N e a uma longitude de 9°W (Figura 6). A temperatura na estufa foi mantida entre os 18 e os 25 °C e, sempre que necessário, utilizou-se uma rede de ensombramento (Figura 7).



Figura 7 - Vista aérea das estufas onde foi realizado o ensaio.



Figura 8 - Interior da estufa, com pormenor da ventoinha e da rede de ensombramento.

O solo utilizado para o ensaio é proveniente da zona do Ribatejo e foi classificado como um Aluviossolo moderno de textura pesada, uma subordem da Classificação dos Solos de Portugal, que corresponde ao agrupamento Fluvisol haplic, da WRB (Sousa *et al.*, 2004).

A variedade de alface testada foi a *Lactuca sativa* (var. *capitata*) e as plantas foram obtidas nos viveiros Geminarte Lda, em Sintra, onde tinham sido semeadas em 'mottes' com 43 cm³ de volume. A escolha da variedade teve por base o período da estação do ano em que decorreu o ensaio, pois, como são de folha mais robusta e frisada, resistem melhor ao calor.

O composto orgânico foi fornecido pela empresa Entogreen, onde foi produzido de acordo com a legislação portuguesa (DGAV, 2018), tendo resultado de um processo de decomposição, efetuado pelas larvas de MSN, usando subprodutos de origem

agroindustrial (batata e cebola). O processo de decomposição teve uma duração aproximada de 15 dias.

Como o solo utilizado tem tendência para o encharcamento e como foi crivado, previamente, com uma rede de 2mm (agravando a sua tendência para compactar e consequentemente, encharcar com mais facilidade), foi acrescentado aos vasos, cujo volume é de 4,5L, uma mistura de solo com perlite, numa proporção de 4:1, respetivamente, com o propósito de aumentar a porosidade do solo e para melhorar a circulação do ar e da água.

O delineamento experimental do presente ensaio consistiu em 6 modalidades, com 5 repetições cada, onde se avaliaram diferentes taxas de aplicação do composto orgânico, contra uma modalidade mineral (que recebeu fertilizante mineral) e uma modalidade mistura (que recebeu uma mistura dos dois tipos de fertilizantes, mineral e orgânico).

A dotação de fertilizante aplicada utilizar, com o objetivo de avaliar a capacidade fertilizante do composto, foi estabelecida com base nas necessidades da cultura da alface em N. Para além da fertilização estipulada, não se adicionou mais nada ao solo. Para o cálculo da quantidade de N a fornecer à cultura, assumiu-se que, para a alface, com um compasso de plantação de 40x40cm e uma produtividade esperada de 25 a 30 t ha⁻¹, a exportação seria de 90 Kg de N ha⁻¹. Desta forma, e nas referidas condições, cada alface (vaso), nos tratamentos em que se forneceu 100% do N necessário para a planta, recebeu 1,5 g de N (quer como fertilizante mineral, quer como orgânico).

O fertilizante mineral escolhido (de nome foskasuper[®]) tinha uma proporção de 7-14-14 (suplementado com B e Mg), em unidades fertilizantes NPK, indicando a percentagem de N (na forma amoniacal), de P (em P₂O₅) e de K (em K₂O). A escolha recaiu sobre este adubo, uma vez que o composto orgânico continha aqueles nutrientes na proporção de 1-2-2. Para a fertilização de cobertura, foi usada uma solução de ureia, contendo 46% de N.

As modalidades testadas foram as seguintes: **T0 – controlo**, onde não se aplicou qualquer tipo de produto, ou seja, não houve fertilização; **Tm - fertilização mineral**, este recebeu 1/3 da quantidade de fertilizante mineral em fundo (homogeneizando o produto com a terra) e 2/3 em cobertura, ao fim de 4 semanas; **T1, T2 e T3 – fertilização orgânica** com, respetivamente, **50%, 100% e 150% das necessidades em N** da alface, aplicado em fundo, e; **T4 - fertilização mista**, tendo incluído **1/3 do N** administrado através do **fertilizante mineral** e **2/3** através do **composto orgânico**, ambos aplicados em fundo.

No Quadro 7 podemos ver quais as quantidades de N e de cada fertilizante aplicadas em cada um dos tratamentos efetuados no ensaio das alfaces

Quadro 7 - Descrição das modalidades.

Modalidades	Produto aplicado	Porcentagem das necessidades em N aplicada (%)	Quantidade em azoto (g)	Quantidade de fertilizante (g)
T0	Nenhum	0	0	0
T1	Composto orgânico	50	0,75	31
T2	Composto orgânico	100	1,5	62
T3	Composto orgânico	150	2,25	93
T4	Fertilizante mineral (1/3) + composto orgânico (2/3)	100	1,5	7,14 + 41
Tm	Fertilizante mineral	100	1,5	7,14 + 2,174

Ao longo do ensaio, manteve-se o teor de humidade da mistura (terra + composto) constante, por pesagem individual dos vasos, correspondente a 80 % da capacidade de campo da terra (calculada através de um método expedito realizado em laboratório), tanto para poupar água como para evitar saturação de água no solo. Foi usada água destilada, para não interferir com a fertilização.

As alfaces foram plantadas no dia 31 de julho, tendo-se colocado uma alface por vaso, e de seguida procedeu-se a uma rega ligeira para acomodar a raiz da planta. O ensaio foi acompanhado em dias alternados, para regar os vasos, para mudar os vasos de lugar, de modo a homogeneizar os efeitos da corrente de ar e da luminosidade, e para proceder à limpeza de infestantes (muito poucas).

A colheita das alfaces (parte aérea) foi feita no dia 11 de setembro, quando se fez o corte da planta ao nível do colo da raiz, com uma faca de plástico, de forma evitar contaminações por metais.



Figura 9 – Fotografia tirada após a plantação das alfaces.

2.2. Métodos para avaliação do composto orgânico

O presente composto já tinha sido usado para outro ensaio, também incluído no projeto Entovalor, altura em que foi analisado, nos laboratórios do INIAV, de acordo com os métodos estabelecidos pela British Standards Institution (BSI), para as seguintes características:

- Humidade - EN 13040:2007;
- Matéria seca - obtida pela diferença entre o peso seco e a humidade determinada;
- pH - EN 13037:2011;
- Condutividade elétrica - EN 13038:2011 (expressa em mScm^{-1} , de acordo com o DL 103/2015);
- Matéria orgânica - EN 13039:2011 (Fração carbónica livre de humidade e agentes orgânicos);
- Valores totais de K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Ni, Cr e Pb - EN 13650:2001.

A determinação do N total foi realizada segundo o método de Kjeldahl (Bremner, 1965), explicado no ponto 2.3. Para determinar o N inorgânico, foi usado uma extração com cloreto de potássio, seguida de destilação com óxido de magnésio, para determinar o N-NH_4^+ , ou com liga de Devarda, para determinar N-NO_3^- ; N-NO_2 foi determinado por colorimetria (determinação quantitativa). O N orgânico foi obtido pela diferença entre o N-Kjeldahl e N-NH_4^+ .

Para a determinação de P, Fe, Mn e B, o material foi incinerado a $550 (\pm 25) ^\circ\text{C}$ e digerido com uma solução clorídrica, após o qual, o material foi filtrado e as amostras foram analisadas para determinação do conteúdo mineral, usando “inductively coupled plasma” (ICP).

A concentração de Hg foi avaliada de acordo com a norma portuguesa PE-005-LQARS/LAP (edição 1 de 2015/01/20). Foi analisado para a presença de *Escherichia coli*, de acordo com a norma ISSO 16649-3:2005.

2.3. Métodos para a avaliação química do solo

A colheita e a preparação das amostras de terra foram executadas utilizando materiais de plástico, de modo a evitar possíveis contaminações com elementos metálicos. Previamente ao ensaio, as amostras de solo foram secas à temperatura ambiente, seguidas de destorroamento mecânico e crivagem, de modo a obter solo solto, com partículas de diâmetro inferior a 2 mm. As amostras de solo colhidas no fim do ensaio receberam o mesmo tratamento.

As determinações analíticas realizadas à terra foram realizadas no laboratório do INIAV, no polo de Oeiras, como em baixo se descreve:

A medição do pH consiste na leitura por potenciometria com elétrodo de vidro (Metrohm Herisan pH-Meter E516 Titriskop), numa suspensão de terra: água na relação 1:2,5 (p/v), após uma hora de contacto por agitação.

Para determinar o conteúdo em micronutrientes foi realizada uma extração com o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) (Lindsay e Norvell, 1978); foi escolhido este método uma vez que o pH da amostra de solo inicial é básico. Foram acrescentados 60 mL de DTPA a 30 g de solo, seguido de agitação, durante 2h a 120 ciclos/min., após o qual foi realizado uma filtragem, com papel de filtro Whatman 42. As amostras depois lidas, no espectrofotómetro de absorção atómica "Thermo Scientific iCE 3000 series" (Figura 19 do anexo), para leitura das concentrações dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn disponíveis.

Para ter uma estimativa da matéria orgânica, foi determinado o conteúdo em C orgânico, através do método de Walkley-Black, por via húmida por oxidação com dicromato de K em meio ácido e a quente, com posterior quantificação por titulação (Walkley, 1946).

O N "total", que contém a forma orgânica (95-98%) e a inorgânica foi, assim como nas amostras do composto, foi determinado segundo o método de Kjeldhal (Bremner, 1965), que, mais detalhadamente, consta de 3 etapas:

- a digestão/mineralização da amostra: são pesados 2,5g de terra e são transferidos para tubos digestores, que de seguida são colocados numa unidade de digestão (Figura 16 do anexo), com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e uma pastilha de catalisador para Kjeldhal. Esta fase serve para converter o N orgânico em amónio ($N-NH_4^+$).
- a destilação do digerido, onde são colocados 20 mL de ácido bórico a 2% (H_3BO_3) num Erlenmeyer, já contendo o indicador misto, num destilador (Figura 17 do anexo) que automaticamente adiciona 50 mL de soda cáustica a 40% (NaOH) aos tubos digestores. Os tubos de condensação da destilação ficam mergulhados no ácido bórico, para evitar perdas de amónio. Nesta fase ocorre

a libertação de todo o N-NH_4^+ , que fica retido no ácido bórico. e, finalmente, a titulação do resultado da destilação, com uma solução que contém ácido clorídrico, até ao momento em que o indicador mudar de verde para róseo. Esta última fase serve para o doseamento do N-NH_4^+ .

O K “extraível” foi determinado com uma extração usando o método de Egnér-Rhiem, usando uma solução de lactato de amónio 0,1 N e ácido acético 0,4 N a pH 3,6 - 3,7, com duas horas de agitação (Balbino, 1968) e doseamento por fotometria de chama, num fotómetro “Sherwood Scientific modelo 410” (Figura 20 do anexo);

Por último, o P “extraível” foi determinado de acordo com o método de Olsen (Olsen e Sommers, 1982), uma vez que com o extratante utilizado neste método diminui a precipitação secundária do P em solos neutros, como é o caso. Neste método, o extratante é uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,5 M, a pH 8,5. A extração consiste em juntar 5g de solo com 100mL da solução extrativa (usada em relação 1/20), adicionando também $\pm 0,4$ g de carvão ativado. De seguida é colocado num agitador orbital, durante 30 minutos, a 120 batidas/min., para depois ser filtrado, usando papel filtro Whatman 42. As concentrações são então obtidas por colorimetria, num espectrómetro de absorção molecular “Thermo Scientific Evolution 201” (Figura 18 do anexo).

2.4. Métodos para a determinação da atividade microbiana no solo

A atividade da **desidrogenase** foi determinada através da redução do substrato 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) para trifenil formazan (TFF), segundo uma adaptação do método desenvolvido por Casida *et al.* (1964) (referido em Tabatabai *et al.*, 1994). O procedimento consistiu em pesar 300 mg de terra e suspender em 200 μL de 1 M Tris-HCl (pH 7,5), adicionando também 100 μL de TTC a 3%. As amostras foram, de seguida, ao vórtex, a baixa velocidade, e colocadas a incubar, durante 24 h a 37°C, às escuras, uma vez que os sais de tetrazolium são fotossensíveis (Tabatabai, 1994). Após a incubação, o TFF produzido foi extraído com quatro lavagens de 500 μL de metanol, cada uma seguida de centrifugação a 13 000 rpm durante 10 minutos (Figura 22 do anexo). Os sobrenadantes resultantes de cada lavagem foram reunidos em cuvetes e foi medida a intensidade da cor, num espetrofotómetro (Figura 21 do anexo), a 485 nm de comprimento de onda. As quantidades de TFF produzidas são determinadas segundo uma curva de calibração preparada com quantidades conhecidas de TFF, com absorvâncias correspondentes. Para cada combinação de modalidade com repetição ($6 \times 5 = 30$) foram realizados 8 ensaios, em que 2 são em branco (controlo, em que não foi adicionado substrato).

No caso da medição da atividade enzimática da **β -glucosidase**, usou-se uma solução tampão com o substrato p-nitrofenil- β -glucósido (PNG) (cuja ligação é quebrada pela enzima), segundo uma adaptação do método de Tabatabai (1994). O procedimento consistiu em pesar 100 mg de terra e juntar 600 μ L de MUB a pH 6,5 mais 150 μ L de PNG. De seguida, a amostra é colocada a incubar, durante 1h a 37°C, ao fim da qual é parada a reação com cloreto de cálcio 0,5 M (CaCl_2) e Tris 0,1 M, a pH 12, seguido de vortéx. A amostra é, depois, centrifugada, a 13 000 rpm durante 10 minutos, e é retirado o sobrenadante, onde estará o p-nitrofenol, resultante da hidrólise de PNG, para uma cuvete para ser lida a absorvância no espectrofotómetro, a 400 nm. Para cada combinação de modalidade com repetição foram realizados 10 ensaios, em que 2 são em branco (sem substrato).

2.5. Métodos para a avaliação química do material vegetal

Relativamente ao material vegetal, foram realizados os mesmos procedimentos para as amostras iniciais, das alfaces vindas do viveiro, e para o material colhido no fim do período experimental, usando todas as folhas da alface. É de salientar que, no caso da análise inicial, foi usada uma amostra compósita das folhas de 90 alfaces, enquanto, nas análises finais, foram analisadas as amostras, por modalidade e por repetição, ou seja, cada alface individualmente.

No final do ensaio, foram colhidas as alfaces e avaliado o respetivo peso verde (PV), por modalidade e repetição. Seguidamente, o material vegetal foi lavado, tendo-se, para o efeito, passado três vezes por água desionizada e, de seguida, colocado em estufa, para secagem, a 65°C, até atingir peso constante (48h), seguido da determinação do peso seco (PS). O material, depois de seco, foi moído, num moinho de bancada, e crivado a 0,5 mm, com o cuidado necessário para evitar contaminações cruzadas entre as amostras.

Para a avaliação da composição química do material vegetal inicial, a extração foi por via seca, onde se colocou um grama de amostra a digerir em mufla, a $\pm 700^\circ\text{C}$, durante 16h. As cinzas resultantes foram dissolvidas em meio ácido, com ácido clorídrico a 5% (HCl), seguidas de filtragem com papel de filtro Whatman 41, para serem quantificados os teores dos seguintes elementos: P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn e Cu.

Para a determinação de P, a leitura foi feita num aparelho de espectrofotometria de absorção molecular (EAM); para o Na e K, foi por espectrofotometria de emissão de chama (EEC); e para os restantes nutrientes (Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu) foi por espectrofotometria de absorção atómica (EAA).

O N total foi quantificado segundo o método de Kjeldhal, usando o mesmo procedimento que foi aplicado às amostras de solo (digestão, destilação e titulação das amostras, nesta ordem).

2.6. Análise estatística

Os dados colhidos neste ensaio foram analisados, usando a análise de variância (ANOVA) a um fator (a modalidade), com 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), após verificação da normalidade da amostra e demais pressupostos. Nos casos em que se identificou influência da modalidade no parâmetro analisado, procedeu-se à comparação de médias com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Para o pretendido, foi usado o programa R x64 3.6.2 (<https://www.r-project.org/>).

3. Resultados e discussão

3.1. Composição físico-química do composto

Os resultados da análise físico-química efetuada ao composto orgânico utilizado são apresentados no Quadro 8.

Quadro 8 - Caracterização físico-química do composto orgânico usado no ensaio.

Propriedades	Resultados	Qualidade
Matéria seca	85%	
pH (H₂O) (25 °C)	8.61	
Condutividade elétrica (CE)	2.77 mS/cm	
Matéria Orgânica	83.7%	
N (Kjeldhal) total	28.1 g kg ⁻¹	
N orgânico	25.71 g kg ⁻¹	
N-NH₄⁺	2.39 g kg ⁻¹	
N-NO₃⁻	86 mg kg ⁻¹	
N-NO₂	6.11 mg kg ⁻¹	
K total	33 g kg ⁻¹	
P total	15 g kg ⁻¹	
Ca total	15 g kg ⁻¹	
Mg total	7 g kg ⁻¹	
Na total	0.3 g kg ⁻¹	
Cu total	19 mg kg ⁻¹	Class I ⁶
Zn total	137 mg kg ⁻¹	Class I
Ni total	<33.3 mg kg ⁻¹	Class I
Cr total	<16.7 mg kg ⁻¹	Class I
Pb total	<33.3 mg kg ⁻¹	Class I
Hg total	<0.006 mg kg ⁻¹	Class I
Fe total	896 mg kg ⁻¹	
Mn total	149 mg kg ⁻¹	
B total	25 mg kg ⁻¹	

⁶ de acordo com os limites de concentração máximos de metais pesados, de acordo com o artigo nº 12 do decreto lei nº103/2015, que “Estabelece as regras a que deve obedecer a colocação no mercado de matérias fertilizantes, assegurando a execução na ordem jurídica interna das obrigações decorrentes do Regulamento (CE) n.º 2003/2003, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de outubro de 2003, relativo aos adubos.”

O resultado obtido para a determinação de *E. coli* revelou uma contagem de 0,3 células por grama de peso fresco, abaixo do nível máximo permitido por lei (DL nº103/2015, artigo 11º), ou seja, apresentava uma baixa carga patogénica de *E. coli*, com muito baixo risco de transmissão de doenças (no caso desta bactéria, algumas estirpes podem causar graves intoxicações alimentares nos seres humanos). A análise revelou um teor baixo de metais pesados, abaixo da concentração máxima permitida por lei em Portugal (DL nº103/2015, artigo 12º), para todos os que foram analisados, e, portanto, o risco da sua toxicidade e bioacumulação, e possível contaminação ao longo da cadeia alimentar, é muito baixo. A granulometria do composto detetada na análise revelou ser inferior a 25 mm. À vista destes resultados, e de acordo a legislação portuguesa, o composto pode ser classificado como um fertilizante orgânico.

Tendo em conta o teor de MO e N total do composto, é possível deduzir uma razão C/N de 17,28, partindo do pressuposto de que a matéria orgânica contém 58% de carbono (Varenes, 2013). Segundo Bloukounon-Goubanal *et al.* (2019), um corretivo orgânico devia ter uma razão C/N, idealmente, de 10 a 20, sendo que razões mais altas são responsáveis pela diminuição da taxa de mineralização, devido à deficiência de N, causando imobilização de N, enquanto razões baixas podem causar toxicidade devido à presença de amónio, resultante da mineralização da MO.

O composto, no fim de digerido pela larva da MSN e separado desta, apresenta características semelhantes à da turfa, conforme se vê na Figura 9.



Figura 10 - Digestor móvel, usado no fabrico do composto (protótipo da Entogreen (DGAV, 2018)).

Conforme se observa no Quadro 8, este composto apresenta uma CE e um pH superior aos limites suportados pela cultura da alface (visto anteriormente no Quadro 4). Como este é apenas aplicado como fertilizante, e não como meio de crescimento (se fosse uma cultura sem solo), não se espera originar problemas no desenvolvimento da

cultura. No entanto, advertem para o efeito que a aplicação deste composto orgânico pode originar, se for usado em grandes quantidades ou proporções.

3.2. Caracterização do solo usado no ensaio

3.2.1. Composição química

No Quadro 9 apresentam-se os resultados obtidos para as características analisadas, quer para a amostra de terra solo inicial, quer para as amostras de solo no final do ensaio. Os resultados apresentados para as amostras do final do ensaio são os valores médios por tratamento, num conjunto de 5 repetições.

Quadro 9 - Resultados das análises químicas realizadas ao solo, antes e depois do ensaio.

	pH	M. O.	N Kjeldhal	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu
	H ₂ O	g Kg ⁻¹ (PS)				mg Kg ⁻¹ (PS)			
Solo inicial	7,16	20,00	1,29	0,03	0,14	16,30	7,89	0,73	1,59
Class.*	Neutro	Baixo	Alto	Baixo	Alto	M. baixo	M. baixo	M. baixo	Baixo
	Média dos 5 vasos (no fim do período experimental)								
T0	7,61 ab	17,23 b	0,47 ab	0,03 c	0,21 c	13,80 b	2,53 b	0,82 b	1,38 b
T1	7,55 b	18,99 b	0,62 ab	0,03 c	0,33 b	21,83 b	2,89 b	0,84 b	1,58 b
T2	7,66 a	22,71 a	0,88 ab	0,04 b	0,41 a	60,34 a	4,23 a	1,25 a	2,43 a
T3	7,57 ab	24,36 a	1,00 a	0,05 b	0,41 a	71,47 a	4,60 a	1,10 ab	2,48 a
T4	7,57 ab	22,69 a	0,83 ab	0,07 a	0,37 ab	28,27 b	2,99 b	0,97 ab	1,78 b
Tm	7,18 c	18,81 b	0,21 b	0,05 b	0,23 c	14,89 b	3,28 b	0,75 b	1,42 b

*Os níveis de referência são retirados de LQARS (2006).

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.

Antes do início do ensaio, o solo apresentava um pH neutro e baixo teor de MO, mas exibia um alto teor em N e K. Os restantes elementos existiam no solo com níveis

baixos ou muito baixos. Segundo a classificação da WRB, este tipo de solo é naturalmente fértil (FAO, 2006).

No final do ensaio, relativamente ao **pH**, a modalidade Tm apresenta um valor significativamente menor do que todas as outras, incluindo do controlo. Este resultado era expectável, na medida em que o composto tinha um pH muito alto. Mesmo não tendo recebido fertilização, as raízes podem ter causado um efeito positivo no pH, explicando o aumento do pH na modalidade T0. T2 foi a modalidade que registou maior valor de pH, não entanto, não difere das restantes modalidades orgânicas.

Em relação ao teor de **MO**, T2, T3 e T4 foram as modalidades onde se registaram os valores mais elevados, com diferenças significativas em relação ao controlo (T0), T1 e a Tm, que não diferiram entre si. O aumento do teor de MO com a aplicação do composto orgânico era previsível, uma vez que o composto é muito rico em MO. A característica do composto em aumentar o conteúdo de MO no solo é de alta importância, tendo em conta o seu papel na produtividade das culturas (fornece nutrientes às plantas conforme sofre decomposição) e manutenção da estrutura do solo.

Segundo Bloukounon-Goubalan *et al.* (2019), este composto orgânico, tendo sido originado pela digestão da larva, espera-se ser rico em **N** na forma mineral abundante (pois sofreu mineralização) e com uma quantidade apreciável de N na forma orgânica, que vai ser lentamente mineralizado de modo a ficar disponível para as plantas. E, como se pode observar no Quadro 9, a modalidade com maior teor total de N é a T3, que corresponde à modalidade com maior quantidade de composto orgânico aplicada.

T2 e T4 revelaram, no fim do ensaio, mesmo teor em N (estatisticamente), sendo que seria de esperar que T4 obtivesse um teor de N mais elevado, uma vez que recebeu 100% da fertilização recomendada (enquanto T2 recebeu apenas 50%). No entanto, o valor foi ligeiramente inferior, talvez devido ao fato de 33% do N foi veiculado através do fertilizante mineral, a forma que é mais facilmente extraída pela planta. E, portanto, é possível que o valor de N que existe no solo na T4, no fim do ensaio, se deva ao fertilizante orgânico, que o mantém durante mais tempo no solo. Atyieh *et al.* (2000) referem ainda que os vermicompostos apresentam a vantagem de libertarem N na forma de nitrato, a forma mineral preferencialmente absorvida pelas plantas, ao contrário dos compostos orgânicos resultantes da compostagem, que libertam N na forma amoniacal. E portanto, o presente composto orgânico não só aumenta o teor de N no solo como, devido à sua forma no solo, é armazenado durante mais tempo.

Relativamente ao conteúdo em nutrientes, as modalidades com teores mais elevados, de quase todos os elementos, correspondem às modalidades orgânicas, mais especificamente, T2 e T3. E, portanto, a aplicação do composto aumentou o teor

nutritivo do solo, como seria de esperar, tendo em conta que a libertação de nutrientes, provenientes da mineralização da MO.

Tm, paralelamente a T0 e T1, foram as modalidades com valores mais baixos, T0 pela razão óbvia de não ter recebido fertilização; T1, porque apenas recebeu 50% da fertilização, e na forma orgânica, ou seja, com libertação de nutrientes mais lenta; e Tm, porque os nutrientes estão na forma mineral, e, portanto, são mais facilmente assimilados pelas plantas, sendo natural o seu teor baixo no solo (como podemos observar a seguir, a Tm foi a modalidade com maior produção de biomassa, logo, maior absorção de nutrientes).

É de frisar o comportamento dos teores de Cu e Zn, micronutrientes cuja concentração elevada pode ser tóxica para as plantas. Estes teores foram mais elevados nas modalidades que receberam composto orgânico em maior quantidade (T2 e T3), evidenciando a necessidade de precaução na aplicação de grandes quantidades de composto. No entanto, para as quantidades aplicadas, os teores finais não se consideram em níveis tóxicos, sendo inferiores a 100 mg kg⁻¹ de matéria seca (MS) e 300 mg kg⁻¹ de MS, para o Cu e Zn, respetivamente (no caso de o pH do solo estar entre 5,5 e 7,0 (LQARS, 2006)) .

3.2.2. Atividade microbiana

Relativamente à atividade enzimática, em ambas as enzimas, os resultados foram bastantes positivos.

No que se refere à atividade enzimática da desidrogenase (expressa em µg de TFF produzido por grama de solo seco e hora), os resultados obtidos, em termos médios, para as 5 repetições e em cada modalidade, são apresentados no Quadro 10 (Figura 23 do anexo).

Quadro 10 – Resultados da atividade enzimática da desidrogenase, reportado ao valor médio dos 5 vasos, por modalidade.

Modalidades	$\mu\text{g de TFF g}^{-1}.\text{h}$
T0	1,74 bc
T1	2,88 bc
T2	3,15 b
T3	5,18 a
T4	2,96 bc
Tm	1,30 c

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.

É possível observar um aumento de atividade com o aumento da quantidade aplicada do composto orgânico, em que a atividade detetada na T3 é significativamente superior à registada no T0, sendo quase 3 vezes maior (Quadro 11) e, portanto, ao maior nível de atividade enzimática detetada, corresponde à modalidade que recebeu a maior quantidade de composto orgânico. Este resultado sugere que a aplicação do composto orgânico contribuiu significativamente para a microbiologia do solo. Assumindo que o composto afetou positivamente a capacidade de retenção de água no solo (que não podemos concluir com certeza uma vez que não foram registados dados de quantidade de água utilizada na rega, ou diferencial de humidade no solo, no final do período experimental), tendo em conta os indícios de saturação de água no solo observados nos vasos das modalidades orgânicas (Figura 12), também pode ter contribuído para os níveis elevados na atividade enzimática da desidrogenase que observámos, uma vez que a sua atividade aumenta em condições de anaerobiose (Makoi e Ndakidemi, 2008).

Pelo contrário, a atividade desidrogenásica na modalidade Tm diminuiu significativamente e em cerca de 25% em relação ao controlo (Quadro 11), apontando para uma diminuição da atividade da desidrogenase com a aplicação do fertilizante mineral, salientando o efeito negativo deste. Este aspeto reflete-se, também, na modalidade T4, que tem um nível total de N aplicado igual ao T2, sendo de esperar que as atividades fossem semelhantes a T2, o que não se verifica (T4 tem menos atividade que T2). Esta discrepância pode dever-se ao facto de T2 ter o N adicionado decorrente

apenas do composto e, em T4, esse mesmo teor de N resulta da combinação de composto com adubo mineral, que, como já se viu, reduz a atividade desidrogenásica. Da conjugação destes dois aspetos resulta uma atividade enzimática intermédia entre T1 e T2, que, no fundo, espelha um nível de composto aplicado intermédio entre as mesmas (uma vez que T1, T2 e T4 receberam, respetivamente, 31g, 62g e 41g de composto).

Salienta-se que as raízes da planta também influenciam a atividade microbiana, estimulando-a (Bandick e Dick, 1999), e por isso se observou um valor elevado de atividade enzimática na modalidade do controlo.

Quadro 11 - Diferença das diferentes modalidades em relação ao T0, que não recebeu nenhuma fertilização, em %, no caso do ensaio da desidrogenase.

% de diferença de T0 – TFF produzido	
T1	165
T2	181
T3	297
T4	170
Tm	75

No caso da avaliação da atividade enzimática da **β -glucosidase** (expressa em μg de PNG produzido por grama de solo seco e hora), os valores obtidos revelaram diferenças significativas entre modalidades (Quadro 12 e Figura 24 do anexo).

Quadro 12 - Resultados da atividade enzimática da β -glucosidase, reportado ao valor médio dos 5 vasos, por modalidade.

Modalidades	μg de PNG $\text{g}^{-1}.\text{h}$
T0	54,79 c
T1	76,71 ab
T2	90,53 a
T3	89,10 a
T4	89,44 a
Tm	61,95 bc

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.

Também aqui se registou um efeito positivo do composto na atividade enzimática da β -glucosidase, apesar de não ser tão evidente como no caso da desidrogenase. T2 é a modalidade com maior nível de atividade enzimática registada e com um aumento de 65%, no entanto, esta não difere significativamente de T3 e de T4 (Quadros 12 e 13). Tm foi, novamente, a modalidade onde se detetou menor quantidade de PNG produzido (excluindo T0), ou seja, a que demonstrou menor atividade enzimática, contudo, contrariamente ao sucedido no estudo da desidrogenase, Tm produziu níveis de atividade superiores ao T0. A modalidade T1, que apenas tinha recebido 50% de N na forma do composto orgânico, foi a modalidade com menor atividade microbiana, a seguir a Tm.

Eivazi e Tabatabai (1990) relataram que o aumento da atividade de glucosidase está significativa e positivamente relacionada com o conteúdo de carbono orgânico no solo, ou seja, com o teor de MO no solo (cuja determinação é com base na fração carbónica do solo). Sendo, por isso, expectável estes resultados, uma vez que as modalidades com a maior atividade enzimática registada, coincidem com as modalidades que obtiveram teores de MO no solo (no fim do período experimental – Quadro 9) mais elevada.

Quadro 13 - Diferença das diferentes modalidades em relação ao T0, que não recebeu nenhuma fertilização, em %, no caso do ensaio da β -glucosidase.

% de diferença do T0 – PNG produzido	
T1	140
T2	165
T3	163
T4	163
Tm	113

É importante referir que, em ambos os casos, o nível de atividade é indicativo, por excedente, uma vez que para estes ensaios, o substrato é fornecido sem limitações, o que não acontece naturalmente, quando a alimentação é o fator limitante da atividade enzimática.

À vista dos resultados da atividade de ambas as enzimas, podemos corroborar a constatação de que o fornecimento de compostos orgânicos ao solo melhora a atividade microbiana do solo, enquanto que a aplicação de fertilização mineral (outros compostos químicos) é nociva para a população microbiana do solo.

O aumento da atividade microbiana está relacionado com o teor de MO no solo, sendo que esta é a fonte de alimento para a maior parte de microrganismos do solo. Estes organismos vão ser responsáveis pela maior parte de reações químicas que ocorrem no solo (Varenes, 2003), sendo bastante relevante na aplicação de compostos orgânicos, uma vez que a ação dos microrganismos estimula a mineralização da MO e, consequentemente, aumenta a disponibilização de nutrientes para a planta.

3.3. Avaliação do material vegetal

3.3.1. Produção de biomassa

Tal como se pode verificar pelos resultados da produção de alface, apresentados no Quadro 14, e dentro das modalidades orgânicas, é possível observar que não houve diferenças significativas entre tratamentos, quer no que se refere à produção de biomassa verde (PV), quer à produção de biomassa seca (PS). Além disso, mesmo não havendo diferenças de produção relativamente ao tratamento controlo, houve uma diminuição de 9%, 62% e 54% para as modalidades T1, T2 e T3, respetivamente, em relação ao T0, sugerindo algum estrangulamento nutritivo ao desenvolvimento da planta, também observável na Figura 11.

Quadro 14 - Valor médio (n=5) da produção (g) de alface, em cada tratamento

Modalidades	PV (g)	PS (g)
T0	28,6 b	2,24 b
T1	26,1 b	1,74 b
T2	16,9 b	1,52 b
T3	13,2 b	1,38 b
T4	144,5 a	7,96 a
Tm	162,5 a	9,26 a

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.



Figura 11 - Alfaces no fim do ensaio, onde a diferença do desenvolvimento das alfaces é bastante distinguível entre as modalidades, onde Tm e T4 produziram maiores alfaces e com folhas mais saudáveis, e as modalidades orgânicas (T1, T2 e T3) produziram alfaces pequenas e com algumas folhas bastante cloróticas.

Em relação ao T4, que recebeu 2/3 da fertilização na forma de composto orgânico, produziu 4 vezes mais em relação ao T0, e o Tm, tendo recebido fertilização mineral, teve 5,4 vezes mais. As diferenças significativas entre as modalidades orgânicas (+ controlo) e as minerais, deve-se, como já referido, à forma mineral em que os elementos estão presentes no fertilizante, tornando-se mais rapidamente disponíveis, sendo prontamente assimilados pelas plantas. Esta diferença parece, pois, indicar que o desenvolvimento do T4 se deve à fertilização mineral e não à fertilização orgânica.

O decréscimo da produção nas modalidades orgânicas, em relação a Tm, foi inesperado, uma vez que se esperava existir N facilmente disponível no composto para a planta assimilar. Este efeito pode estar relacionado com a lenta taxa de mineralização característica dos compostos orgânicos, em combinação com o uso de uma planta de ciclo-curto como a alface, que apresenta um fraco desenvolvimento radicular, necessitando dos nutrientes prontamente disponíveis. Pode também ter ocorrido imobilização de nutrientes ou toxicidade.

Alattar *et al.* (2016), tendo usado um composto resultante da digestão das MSNL (em meio com restos alimentícios) como fertilizante, na cultura do milho, obtiveram uma redução de 39% na altura da planta e de 19% no crescimento foliar, em relação ao controlo. Os autores atribuíram o declínio de produção da cultura, no seu ensaio, ao esgotamento de alguns nutrientes-chave, ou a má drenagem do solo, que conduziu a condições de anaerobiose no solo ou fitotoxicidade, no entanto, provaram que os níveis de amónia no solo não eram tóxicos.

Putra *et al.* (2017), que conduziram um ensaio semelhante na cultura da alface (também fertilizadas com um composto originado pelas MSNL), obtiveram uma

produção de biomassa muito semelhante à deste ensaio, tendo em conta que, para as modalidades que receberam composto, os autores obtiveram pesos verdes entre 11 e 21 g, enquanto que, no presente ensaio, a produção das modalidades orgânicas esteve entre 13 a 26 g.

Noutros casos, contudo, a aplicação do composto surtiu um efeito positivo nas culturas. Zahn (2017) registou um aumento de produção na cultura da cebola após aplicação de um composto orgânico como fertilizante, também originado pela digestão das larvas da MSN. Na Indonésia, Anggraeni (2010) produziu um composto, resultante da bioconversão de resíduos da indústria do óleo de palma por larvas da MSN, tendo obtido resultados positivos no crescimento de feijão-chicote (*Vigna unguiculata*).

Kebli e Sinaj (2017) também obtiveram resultados interessantes, em que a modalidade que recebeu o composto orgânico (igualmente derivado da bioconversão pelas MSNL) teve efeitos positivos em solos pobres, mas não afetou, positivamente, o crescimento da planta em solos mais férteis.

3.3.2. Composição química

Os resultados da análise química do material vegetal (Quadro 15), da amostra inicial (n=90) e das amostras colhidas no final do período experimental, para a média das repetições (n=5) e nas diferentes modalidades, revelaram diferenças significativas, nem sempre consistentes.

Quadro 15 - Conteúdo em nutrientes (valores totais) do material vegetal, no início e no fim do ensaio.

	N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
	g kg ⁻¹ (PS)						mg kg ⁻¹ (PS)			
Amostr a inicial	31,54	8,97	49,38	17,50	10,22	5,74	72,00	32,00	neg	48,00
	Média dos 5 vasos (no fim do período experimental)									
T0	16,20 bc	3,71 ab	50,00 a	30,00 ab	12,09 ab	4,04 b	68,27 ab	81,83 bc	3,21 a	33,07 a
T1	16,55 bc	4,38 a	52,00 a	37,00 a	14,26 a	4,25 ab	49,71 b	107,23 ab	3,21 a	32,50 a
T2	11,58 c	2,79 b	41,40 a	21,35 bc	10,56 ab	4,00 b	72,95 ab	147,56 a	1,10 ab	21,04 b
T3	11,60 c	2,93 b	48,51 a	13,80 c	9,61 b	4,25 ab	57,60 b	145,80 a	0,37 b	19,48 bc
T4	20,10 b	4,29 a	55,00 a	18,75 bc	10,91 ab	3,61 b	57,21 b	72,76 bc	3,30 a	19,75 bc
Tm	32,94 a	3,59 ab	43,00 a	14,50 c	10,05 b	4,80 a	98,31 a	58,16 c	0,24 b	10,77 c

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.

De acordo com os níveis foliares de referência para a alface (Lopes e Simões, 2006), os teores de N, P, K, Ca, Cu e Zn obtidos nas amostras foram insuficientes, no entanto, os níveis de Mg, Fe e Mn são considerados suficientes para o desenvolvimento da planta. Kebli e Sinaj (2017), num ensaio semelhante a este (também usaram alface) obtiveram teores mais elevados de macronutrientes nas modalidades de fertilização mineral, no entanto, as modalidades que receberam composto orgânico apresentaram teores de micronutrientes semelhantes ou superiores em relação ao controlo definido por eles.

Na presente tese, entre as modalidades orgânicas e mineral, o teor de nutrientes (macro e micro) não difere muito, com algumas exceções, como o caso de teor de N. Choi *et al.* (2009), tendo aplicado um composto, também um digerido das MSNL, no desenvolvimento de couves, obtiveram plantas cuja composição química foi idêntica à das couves fertilizadas com um fertilizante sintético.

Os resultados, no caso das modalidades orgânicas, apontam para a deficiência de N, que, apesar de não ser exigido em grandes quantidades para a cultura da alface, é o elemento mais limitante do desenvolvimento desta cultura. Este fato confirma-se com os sintomas visuais bastante evidentes na planta, nomeadamente menor

desenvolvimento, manifestado pela baixa produção de biomassa, e folhas com cores menos intensas, bem como cloroses nas folhas mais velhas (Figura 11). Relativamente a **P**, também um dos macronutrientes principais, os valores são insuficientes e inferiores ao valor inicialmente encontrados nas plantas. Esta diminuição pode ser atribuída, como no caso de N, à imobilização do nutriente, pelos microrganismos do solo, no processo de mineralização da matéria orgânica, uma vez que os microrganismos utilizam maioritariamente N e P (e enxofre também) nas suas atividades metabólicas. Este aspeto é bastante plausível, tendo em conta que as modalidades com maior atividade microbiana, sugerida pela atividade enzimática, coincidem com as que têm menor teor de N e P na parte aérea. Contudo, não houve sintomas de deficiência de P evidentes nas folhas da planta.



Figura 12 - Pormenor de cloroses das folhas mais velhas, sintomas de podem indicar deficiência de azoto na planta. Neste caso, num vaso da modalidade T3.

Com base nas análises químicas realizadas ao material vegetal, foi possível calcular a exportação de nutrientes (Quadro 16), por modalidade e para a média das repetições.

Quadro 16 - Exportação média de nutrientes do material vegetal (média dos 5 vasos), por modalidade.

	Exportação média por 5 vasos									
	N	P	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
	g						mg			
T0	0,030 c	0,006 b	0,100 b	0,059 b	0,024 b	0,008 c	0,130 b	0,169 b	0,007 b	0,062 bc
T1	0,021 c	0,005 b	0,079 b	0,060 b	0,022 b	0,006 c	0,070 b	0,173 b	0,006 b	0,045 bc
T2	0,011 c	0,002 b	0,054 b	0,033 b	0,014 b	0,005 c	0,088 b	0,206 b	0,003 b	0,023 c
T3	0,008 c	0,002 b	0,052 b	0,014 b	0,011 b	0,004 c	0,065 b	0,193 b	0,001 b	0,016 c
T4	0,150 b	0,032 a	0,423 a	0,144 a	0,084 a	0,027 b	0,429 b	0,557 a	0,026 a	0,144 a
Tm	0,305 a	0,031 a	0,398 a	0,135 a	0,092 a	0,044 a	0,936 a	0,532 a	0,002 b	0,089 b

Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

T0 – controlo; modalidades orgânicas: T1 – 50% da fertilização recomendada; T2 – 100% e T3 – 150%; T4 – 1/3 da fertilização é através do fertilizante mineral e o restante é através do composto orgânico; Tm – adubado com o fertilizante mineral, na dose recomendada.

Em relação à exportação do **N**, que foi o parâmetro de diferenciação entre modalidades, a Tm e T4 exportaram significativamente mais N do que as outras modalidades, o que é bastante natural uma vez que uma melhor absorção de nutrientes conduz a um melhor desenvolvimento da planta, conforme se vê no vaso da Tm, representado na Figura 13. Este resultado era expectável, uma vez que todo o N fornecido estava na forma mineral. É de salientar que a Tm obteve valores de absorção de Mg significativamente superiores às outras modalidades, uma vez que o fertilizante mineral também o fornecia. A seguir à modalidade Tm, a T4 foi a modalidade onde se registou um valor de exportação significativamente mais elevado de N, relativamente às restantes modalidades, e devido às diferenças significativas entre esta e as restantes modalidades orgânicas, é possível admitir que a quantidade exportada de N, na modalidade T4, seja proveniente da fertilização mineral que recebeu.

O comportamento da planta em relação aos outros nutrientes, macro e micro, foi semelhante, as modalidades T4 e Tm tiveram valores de exportação sempre mais elevados do que nas restantes modalidades.

Tendo em conta as modalidades orgânicas, estas apresentam uma menor exportação de N, em relação à modalidade mineral. Este decréscimo coincide com o observado na produção de biomassa, em que as modalidades que retiraram menos N foram as que produziram menor quantidade de biomassa (Figura 13). Este facto é

perfeitamente justificável, já que a produção maior conduz a uma exportação mais elevada de nutrientes, considerando não haver grandes diferenças na concentração dos mesmos nos tecidos da planta.



Figura 13 - Comparação de uma alface T3 e de uma alface Tm, no fim do ensaio, em que a alface T3 apresenta um crescimento muito reduzido, com folhas pequenas e cloróticas, enquanto que a alface Tm apresenta folhas significativamente maiores e mais verdes, com um crescimento muito superior em relação à T3.

A hipótese de imobilização de N mantém-se, uma vez que o solo apresenta teores de N superiores com a aplicação do composto, mas as plantas correspondentes apresentaram menor capacidade para o extrair do solo. A imobilização do N ocorre, principalmente, nas primeiras fases de mineralização do composto orgânico (quando é aplicado ao solo), maioritariamente com compostos com uma alta razão de C/N, uma vez que os organismos decompositores imobilizam N para decompor os compostos celulósicos (Smill, 1999; Bloukounon-Goubalan et al., 2019).

No entanto, o composto fornecido estava estável e maturo e com a razão C/N calculada de 17, indicando que existe disponibilidade suficiente de N para os microrganismos decompor os materiais orgânicos presentes no composto, evitando a imobilização de nutrientes. Portanto, a causa da possível imobilização de nutrientes poderá ser o nível elevado de atividade microbiana, sugerida pelos resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática no solo, uma vez que níveis enzimáticos elevados conduzem à limitação do conteúdo mineral do ecossistema (Makoi e Ndakidemi, 2008). Em casos de culturas de ciclo longo, o tempo em que a cultura está no solo permite a

mineralização da matéria orgânica, efetuada pelos microrganismos; o que pode não ter acontecido no presente ensaio, uma vez que a alface é uma cultura de ciclo curto e considerando que apenas esteve 43 dias no solo. Assim, a conjugação destes dois fatores pode ter restringido a disponibilização de nutrientes para a planta, atrasando e inibindo o seu desenvolvimento. Para verificar ou comprovar esta hipótese, terão de ser realizados novos ensaios.

Condições de encharcamento do solo podem também conduzir a uma menor absorção de nutrientes, uma vez que a falta de oxigénio no solo impede a respiração das células radiculares, o que prejudica a produção de energia que possibilita o transporte dos iões e moléculas através das membranas celulares (Varennnes, 2003). Este efeito de saturação do solo em água foi observado nos vasos, principalmente nos vasos das modalidades orgânicas (Figura 14), apesar de aparecer também no controlo, o que se deve a uma considerável capacidade de retenção de água, característica de um solo argiloso. Este efeito foi observado em maior grau nas modalidades orgânicas, o que pode indicar que a adição do composto afete positivamente a capacidade de retenção de água do solo. No entanto, este aumento não foi quantificado e, por isso, não é possível concluir se é a causa da baixa absorção de nutrientes, por parte da planta.



Figura 14 - Aparecimento de limo (manchas verdes) na superfície do solo, que é uma vegetação que surge em condições de muita humidade.

O estudo realizado por Putra *et al.* (2017), tendo testado o efeito de um composto, obtido através de bioconversão das MSNL em cascas de café, na produção de biomassa e na exportação de N, P e K para alface, mostrou que a aplicação do

composto foi suficiente para suprir as necessidades de P e K da alface, contrariamente ao observado no presente estudo.

3.4. Outras considerações

Relativamente aos metais pesados, que é uma preocupação que advém da aplicação de compostos orgânicos, foram avaliados os teores de Fe, Cu, Zn e Mn, no início e no fim do período experimental, no material vegetal e no solo. O teor foliar destes nutrientes, que observámos no Quadro 15, estava dentro dos limites adequados para uma folha completamente desenvolvida e saudável da alface (Quadro 5). E, por isso, a aplicação do composto orgânico, nas presentes condições, não aumentou o teor de metais pesados no material vegetal para um nível tóxico. O mesmo se pode afirmar no solo, uma vez que o teor de nutrientes nele presentes (Quadro 9), no fim do período experimental, no caso de Cu e Zn, foram inferiores aos valores-limite recomendados para a concentração de metais pesados nos solos destinados à agricultura (LQARS, 2006). Nesta publicação é referido que, para um solo de pH superior a 7,0, como é o caso, o valor-limite para Cu e Zn é, respetivamente, 100 e 200 mg Kg⁻¹ de peso seco, não havendo referência ao Fe e Mn, uma vez que são pouco suscetíveis de causar problemas de toxicidade no solo. E, como podemos observar, os teores obtidos nas análises químicas realizadas ao solo são significativamente inferiores a estes valores.

No Quadro 8, a composição em metais pesados do composto orgânico produzido pela Entogreen® está abaixo do limite máximo permitido por lei em Portugal e, por isso, o risco de acumulação de metais pesados é baixo. Contudo, como se verificou um enriquecimento, no caso das modalidades orgânicas, de Fe, Zn e Cu no solo, e de Mn no material vegetal, no fim do período experimental, é necessário uma avaliação continuada deste efeito, para verificar se existe acumulação destes metais a longo-prazo, causado pela adição do composto orgânico da MSN.

Foi também observado uma maior capacidade de retenção de água no solo dos vasos que receberam o composto orgânico (Figura 14). Contudo, uma vez que não foram feitos registos da quantidade de água utilizada em cada vaso, durante o período em estudo, não há valores que permitam tirar conclusões definitivas, havendo apenas indicação por observação. Para além destes sinais visíveis de conservação de água no solo, as alfaces (que tinham sido cortadas ao nível do colo da planta) dos vasos das modalidades que receberam composto orgânico e do controlo voltaram a rebentar (Figura 15), depois de estarem uma semana na estufa, sem serem sujeitas a rega ou

outro tipo de tratamento, e o solo ainda se apresentava bastante húmido. Pelo contrário, nos vasos que receberam fertilização mineral, não rebentou nenhuma planta e o solo aparecia claramente seco, ainda mais do que o tratamento controlo. O que comprova o conhecimento atual da fertilização sintética, a sua adição produz poucos ou nenhuns efeitos benéficos na qualidade do solo, a longo-prazo, e em comparação com a fertilização orgânica.

Está previsto fazer um ensaio experimental, em que se vão reutilizar as terras do presente ensaio para colocar um segundo ciclo de alface, como forma de avaliar o enriquecimento que se promoveu no solo com a aplicação deste composto e a possível disponibilização dos nutrientes para a planta, por via da mineralização do composto orgânico.

Será também relevante avaliar este efeito positivo na capacidade de retenção de água no solo, causado pela adição do composto orgânico, uma vez que permite a poupança de água, o que por si só é um efeito muito benéfico para os solos de Portugal, tendo em conta o clima seco, e para a produção de herbáceas, que são exigentes em água. A avaliação consistirá na contabilização da quantidade de água aplicada em cada vaso, ao longo do ciclo cultural da planta.



Figura 15 - Alfaces a rebentarem do colo da raiz nas modalidades orgânicas e no controlo (ordem dos vasos (da esquerda para a direita): T0, Tm, T1, T2, T3 e T4).

4. Conclusões

Com base nos resultados do presente ensaio, foi possível concluir que a adição do composto orgânico, resultante da digestão de subprodutos agro-industriais (neste caso, batata e cebola) pelas larvas da MSN, não favoreceu a produtividade da cultura, demonstrando efeitos negativos na produção com a aplicação do mesmo (quando comparado com a alternativa mineral). Este efeito atribui-se ao facto de ter sido usada uma cultura de ciclo curto, como a alface, na avaliação da capacidade fertilizante de um composto orgânico, uma vez que este tipo de produtos apresentam uma taxa de mineralização relativamente lenta, não acompanhando as necessidades nutricionais da cultura em causa.

Inicialmente, pensou-se que este decréscimo fosse devido à imobilização de N, nas fases iniciais de decomposição da MO, no entanto, com o cálculo da razão C/N, verificou-se que o composto tinha uma razão que permitia uma taxa de mineralização relativamente boa. Contudo, a intensa atividade enzimática observada nas modalidades orgânicas pode, de facto, ter contribuído para alguma imobilização de nutrientes. A baixa produtividade da cultura pode, também, estar relacionada com a quantidade de água retida no solo das modalidades que receberam o composto orgânico, que pode ter originado condições mais próximas de anaerobiose, prejudicando a respiração radicular e consequentemente a absorção de nutrientes por parte da raiz. Contudo, para comprovar este efeito são necessários novos ensaios experimentais.

No futuro seria interessante estudar a taxa de mineralização do composto, através do cálculo do ião amónio, transformado a partir de N orgânico, ou através do estudo da atividade enzimática das enzimas presentes nos processos de mineralização de N, para ser possível concluir sobre as hipóteses referidas acima.

Apesar de a aplicação do composto não apresentar benefícios a curto-prazo como fertilizante da cultura da alface, tendo em conta que não aumentou a sua produtividade, apresentou benefícios para o solo, como o aumento de teor de nutrientes e da atividade microbiana, melhorando as características físico-químicas do solo, podendo vir a ser benéfico para outras culturas ou futuros ciclos culturais da alface, aconselhando-se, no presente caso, o seu uso como corretivo orgânico.

A aplicação combinada do fertilizante mineral com o composto orgânico (T4), com uma taxa de substituição do fertilizante mineral de 67%, apresentou resultados bastante positivos na produção da cultura, não tendo sido significativamente diferente da produção obtida na modalidade Tm (que tinha recebido a totalidade da sua fertilização na forma mineral). Mas ao contrário da Tm, T4 apresentou efeitos bastante benéficos na qualidade do solo, melhorando as características físico-químicas e

biológicas do solo. Assim, ao reduzir o uso de fertilizantes minerais, estamos também a diminuir os impactes ambientais associados à sua prática e, com o aproveitamento dos resíduos orgânicos para a produção de compostos orgânicos, estamos a diminuir os recursos consumidos, a diminuir o volume abissal de resíduos produzidos e, ainda, a diminuir os custos de produção de inputs na produção agrária.

Com a adoção desta prática, é possível fechar o ciclo de produção e contribuir para uma economia circular, onde os subprodutos da produção agroalimentar são reaproveitados e reinseridos na cadeia produtiva, muito mais sustentável e económico.

O presente ensaio foi realizado em condições controladas e, por isso, estes resultados não podem ser extrapolados para ensaios em campo. A bibliografia relacionada com a conversão realizada pelas larvas da MSN e os artigos sobre os benefícios da larva nas rações animais já são numerosos, e o potencial do composto resultante também já foi comprovado em alguns estudos, no entanto, a procura de conhecimento nesta área deve continuar, com novas culturas e com condições edafoclimáticas diferentes, para se ter um melhor entendimento de como utilizar esta prática mais eficientemente e produtivamente. São também necessários estudos a longo-prazo, de modo a testar a sustentabilidade da aplicação do composto e para estudar os seus efeitos no ambiente a longo-prazo.

Bibliografia

- Adesemoye, A.O. and Kloepper, J.W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1-12.
- Aggrey Jnr, J.K. (2017). *Feasibility of "black soldier fly larvae" composting and its utilization for vegetable farming in better Accra, Ghana*. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirement for Agricultural Economics Degree. College of Basic and Applied Sciences, University of Ghana.
- Alattar, M., Alattar, F. and Popa, R. (2016). Effects of microaerobic fermentation and black soldier fly larvae food scrap processing residues on the growth of corn plants (*Zea mays*). *Plant Science Today* **3** (1):57-62.
- Alef, K., Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. 1st Edition, Academic Press. London.
- Almeida, D. (2013). *Manual de culturas hortícolas, volume I*. 2^a Edição, Editorial presença, Lisboa.
- Anggraeni, D. (2010). Pengaruh pemupukan bioconversion fertilizer palm kernel meal (bfpkm) terhadap pertumbuhan vigna unguiculata L. walp (kacang panjang) varietas Mutiara. Thesis submitted to fulfil requirements for master's degree. Universitas Indonesia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Atiyeh, R.M., Subler, S., Edwards, C.A., Bachman, G., Metzger, J.D. and Shuster, W. (2000). Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. *Pedo biologia* **44**: 579-590.
- Balbino, L.R. 1968. O método de Egnér-Rhiem na determinação do fósforo e do potássio "assimiláveis" em solos de Portugal. *Revta Agron.*, **51**: 46-56.
- Bandick, A.K., Dick, R.P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1471-1479.
- Banks, I.J., Gibson, W.T. and Cameron, M.M. (2014). Growth rates of black soldier fly larvae fed on fresh human faeces and their implication for improving sanitation. *Tropical Medicine and International Health* **19** (1): 14-22.
- Barragan-Fonseca, K.B., Dicke, M. and Loon, J.J.A. (2018). Influence of larval density and dietary nutrient concentration on performance, body protein, and fat contents of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **166**: 761-770.
- Bloukounon-Goubalan, A.Y., Saïdou, A., Chrysostome, C.A.A.M., Kenis, M., Amadji, G.L., Igué, A.M. and Mensah, G.A. (2019). Physical and chemical properties of the agro-

processing by-products decomposed by larvae of Musca domestica and Hermetia illucens. Waste and Biomass Valorization.

- Bremner, J.M. 1965. Total nitrogen. In: Black, C.A.; Evans, D.D.; White, Y.L.; Euseminger, L.E. e Clark, F.E. (Eds). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties: 1149-1178. Agronomy 9. Am. Soc. Agron., Inc., Publish. Madison.
- Eawag: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology. (2017). Dortmans B.M.A., Diener S., Verstappen B.M., Zurbrügg C. (2017). *Black Soldier Fly Biowaste Processing - A Step-by-Step Guide*, Dübendorf, Switzerland.
- Čičková, H., Newton, G.L., Lacy, R.C. and Kovánek, M. (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Management* **35**: 68-80.
- Caruso, D., Devic, E., Subamia, I., Talamond, P., Baras, E. (2013). *Technical Handbook of Domestication and Production of Diptera Black Soldier Fly (BSF) Hermetia illucens, Stratiomyidae*. IPB Press, Kampus IPB Taman Kencana Bogor.
- Casida, L., Klein, D. and Santoro, T. (1964). Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science*, **98**: 371-376
- Choi, Y., Choi, J., Kim, J., Kim, M., Kim, W., Park, K., Bae, S. and Jeong, G. (2009). Potential usage of food waste as a natural fertilizer after digestion by *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Int. J. Indust. Entomol.* **19** (1): 171-174.
- Diener, S., Gutiérrez, F.R., Zurbrügg, C. and Tockner, K. (2009a). Are larvae of the black soldier fly – *Hermetia illucens* – a financially viable option for organic waste management in Costa Rica?. In: *Twelfth International Waste Management and Landfill Symposium*. Cagliari, 5-9 October, Italy.
- Diener, S., Zurbrügg, C. and Tockner, K. (2009b). Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optima feeding rates. *Waste Management & research* **27**: 603-610.
- Diener, S., Zurbrügg, C. *et al.* (2011). Black soldier fly larvae for organic waste treatment – prospects and constraints; WasteSafe 2011. *2nd International Conference on Solid Waste Management in the Developing Countries*, Khulna, Bangladesh. pp. 52 (1-8).
- Diener, S., Semiyaga, S., Niwagaba, C.B., Muspratt, A.M., Gning, J.B., Mbéguéré, M., Ennin, J.E., Zurbrügg, C. and Strande, L. (2014). A value proposition: Resource recovery from faecal sludge – Can it be the drive for improved sanitation?. *Resources, Conservation and Recycling* **88**: 32-38.
- Diener, S., Zurbrügg, C. and Tockner, K. (2015). Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *Journal of Insects as Food and Feed* **1** (4): 261-270.

- Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. (2018). *Insect Production, Processing and Use in Animal Feeding*. DGAV. Lisboa
- Eivazi, F. and Tabatabai, M.A. (1990). Factors affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* **22** (7): 891-897.
- FAO. (2006). World Reference base for Soil Resources. Rome
- FAO. (2013). Edible insects, Future prospects for food and feed security. Rome
- FAO. (2014). Building a common vision for sustainable food and agriculture, Principles and approaches. Rome
- Fernandes, R. (2016). A matéria orgânica do solo. Dossier técnico, *Vida rural*, Maio 2016.
- García-Gil, J.C., Soler-Rovira, C.P.P. and Rojo, A. (2000). Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 1907-1913.
- Ghorbani, R., Koocheki, A., Jahan, M. and Asadi, G.A. (2006). Effects of organic fertiliser and compost extracts on organic tomato production. *Aspects of Applied Biology* 79: *What will organic farming deliver? COR 2006*.
- Gobbi, P., Martínez-Sánchez, A. and Rojo, S. (2013). The effects of larval diet on adult life-history traits of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Eur. J. Entomol.* **110** (3): 461-468.
- Gold, M., Tomberlin, J.K., Diener, S., Zurbrugg, C. and Mathys, A. (2018). Decomposition of biowaste macronutrients, microbes, and chemicals in black soldier fly larval treatment: a review. *Waste Management* **82**: 302-318.
- Goyal, S., Mishra, M.M., Dhankar, S.S., Kapoor, K.K. and Batra, R. (1993). Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications. *Biol. Fertil. Soils* **15**: 60-64.
- Hakim, A.R., Prasetya, A. and Petrus, H.T. (2017). Feeding rates study on the bioconversion of tuna processing waste using *Hermetia illucens* larvae. *JPB Kelautan dan Perikanan* **12** (2): 179-192.
- van Huis, A., Dicke, M. and van Loon, J.J.A. (2015). Insects to feed the world. *Journal of Insects as Food and Feed* **1** (1): 3-5.
- Instituto Nacional de Estatística. (2018). *Estatísticas Agrícolas 2018*. INE I.P. Lisboa
- Jiang, C., Jin, W., Tao, X., Zhang, Q., Zhu, J., Feng, S., Xu, X., Li, H., Wang, Z. and Zhang, Z. (2019). Black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) strengthen the metabolic function of food waste biodegradation by gut microbiome. *Microbial Biotechnology* (2019) **0** (0): 1-16.
- Kebli, H. et Sinaj, S. (2017) Potentiel agronomique d'un engrais naturel à base de digestats de larves de mouches. *Recherche Agronomique Suisse* **8** (3): 88-95.

- Kim, W., Bae, S., Park, K., Lee, S., Choi, Y. Han, S. and Koh, Y. (2011) Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **14**: 11-14.
- Kováčik, P., Kozánek, M., Takáč, P., Galliková, M. and Varga, L. (2010). The effect of pig manure fermented by larvae of house flies on the yield parameters of sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. Volume LVIII, number **2**.
- Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva. (2006). *Manual de fertilização das culturas*. INIAP, Lisboa.
- Lalander, C., Fidjeland, J., Diener, S., Eriksson, S. and Vinnerås, B. (2015). High waste-to-biomass conversion and efficient *Salmonella* spp. reduction using black soldier fly for waste recycling. *Agron. Sustain. Dev.* **35**: 261-271.
- Lindsay, W.L. e Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **42**: 421-428.
- Liu, Q., Tomberlin, J.K., Brady, J.A., Sanford, M.R. and Yu, Z. (2008). Black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae reduce *Escherichia coli* in dairy manure. *Environ. Entomol.* **37** (6): 1525-1530.
- Loganathan, P. 1987 . Soil quality considerations in the selection of sites for aquaculture. ARAC/87/WP/12(5). African Regional Aquaculture Centre, Port Harcourt, Nigeria.
- Lopes, J.I.F. (2008). *Valorização agrícola e avaliação da qualidade de matérias orgânicas fertilizantes*. Tese para a obtenção do grau de Mestre. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Lopes, A. e Simões, A.M. (2006). Produção Integrada em Hortícolas, Família das Asteráceas – Alface. Direcção-Geral de Protecção das culturas. Oeiras, Lisboa.
- Machado, M.A.A.S. (2019). *Utilização das larvas de mosca-soldado-negra (Hermetia illucens (L. 1758)) como substituto parcial da soja em regimes alimentares para frangos de carne*. Dissertação para obtenção de grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.
- Mäder, P., Fliessbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. and Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* **296** (1694).
- Makoi, J.H.J.R., Ndakidemi, P.A. (2008). Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. *Afr. J. Biotechnol.* **7** (3): 181-191.
- Martínez-Sánchez, A., Magaña, C., Saloña, M. and Rojo, S. (2011). First record of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) on human corpses in Iberian Peninsula. *Forensic Science International* **206**: e76-e78.
- Misra, R.V., Roy, R.N., Hiraoka, H. (2003). *On-farm composting methods*. FAO, Rome.

- Morales and Wolff. (2010). Insects associated with the composting process of solid urban waste separated at the source. *Revista Brasileira de Entomologia* **54** (4): 645-653.
- Nana, P., Kimpara, J.M., Tiambo, C.K., Tiogué, C.T., Youmbi, J., Choundong, B. and Fonkou, T. (2018). Black soldier fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) as recyclers of organic waste and possible livestock feed. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **12** (5): 2004:2015.
- Nguyen, T.T.X., Tomberlin, J.K. and Vanlaerhoven, S. (2015). Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environ. Entomol.* 1-5
- Odlare, M., Arthurson, V., Pell, M., Svensson, K., Nehrenheim, E. and Abubaker, J. (2011). Land application of organic waste – Effects on the soil ecosystem. *Applied Energy* **88**:2210-2218.
- Olsen, S.R.; Cole, C.V.; Watanabe, F.S. e Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorous in soils by extraction with sodium bicarbonate. *U.S. Dep. of Agric. Circ.*, **939**.
- Oonincx, D.G.A.B., van Broekhoven, S., van Huis, A. and van Loon, J.J.A. (2015). Feed conversion, survival and development and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *Dietary Effects on Insects for Food and Feed*.
- Pastor, B., Velasquez, Y., Gobbi, P. and Rojo, S. (2015). Conversion of organic wastes into fly larval biomass: bottlenecks and challenges. *Journal of Insects as Food and Feed* **1** (3): 179-193.
- Putra, R.E., Hutami, R., Suantika, G. and Rosmiati, M. (2017). Application of compost produced by bioconversion of coffee husk by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) as solid fertilizer to lettuce (*Lactuca sativa* var. *crispa*): Impact on harvested biomass and utilization of nitrogen, phosphor, and potassium. *In: Proceeding of International Conference on Green Technology* **8**:466-472.
- Rodrigues, M.A. e Coutinho, J.F. (2000). Eficiência de utilização do azoto pelas plantas. Em: *Série Estudos*, Instituto Politécnico de Bragança. Bragança.
- Rosmiati, M., Nurjanah, K.A., Suantika, G. and Putra, R.E. (2017). Application of Compost Produced by Bioconversion of Coffee Husk by Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens*) as Solid Fertilizer to Lettuce (*Lactuca Sativa* Var. *Crispa*): Impact to Growth. *In: Proceeding of International Conference on Green Technology* **8**:38-44.
- Santos, A.P.R. (2016). *Características Agronômicas e Qualidade da Alface (Lactuca sativa L.) sob fertilização orgânica e mineral*. Faculdade de Agronomia e medicina veterinária – Universidade de Brasília.
- Sheppard, D.C., Tomberlin, J.K., Joyce, J.A., Kiser, B.C. and Sumner, S.M. (2002). Rearing methods for the black soldier fly (Dipter: Stratiomyidae). *J. Med. Entomol.* **39** (4): 695-698.

- Silva, A.S.N. (2013). *Doses de Fósforo e de Potássio na Produção da Alface*. Tese submetida como parte das exigências para a obtenção do grau de Doutor em Agronomia. Câmpus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista (UNESP). São Paulo.
- Da Silva, G.B.P. e da Silva, R.P. (2019). Manejo Nutricional da alface – O que é preciso saber. *Campo e Negócios*, março 2019.
- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P. and van Campenhout, L. (2018). Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and Impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology* **84** (9) 17 pp.
- Smil, V. (1999). Crop residues: agriculture's largest harvest. *BioScience* **49** (4): 300-308.
- Sousa, E.C., Madeira, M. e Monteiro, F.G. (2004). A base de referência para solos do mundo e a classificação dos solos de Portugal. Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Ciências do Ambiente, Tapada da Ajuda, Lisboa.
- Sprangers, T., Ottoboni, M., Klotwijk, C., Olyn, A., Deboosere, S., De Meulanaer, B., Michiels, J., Eeckhout, M., De Clercq, P and De Smet, S. (2016). Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared different organic waste substrates. *J. Sci. Food Agric.* **97**: 2594-2600.
- Stamer, A., Wesselss, S., Neidigk, R. and Hoerstgen-Schwark, G. (2014). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae-meal as an example for a new feed ingredients class in aquaculture diets. *Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference. 'Building Organic Bridges'*, 13-15 Oct., Istanbul, Turkey. pp 11043-1046.
- Tabatabai, M.A. Soil enzymes (1994). In: Weaver, R.W., Angle, J.R. and Bottomley, P.S. (eds). *Methods of soil analysis: Microbiological and biochemical properties*. Madison, Soil Science Society America, 1994. Part 2. p.775-833.
- Tavares, H.M.R. (1988). *A Cultura da Alface*. Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, Lisboa.
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: Luch A. (eds) *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. Experientia Supplementum, vol 101. Springer, Basel
- Tomberlin, J.K., Adler, P.H. and Myers, H.M. (2009). Development of the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environ. Entomol.* **38** (3): 930-934.
- Tomberlin, J.K., Sheppard, D.C. and Joyce, J.A. (2002). Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets. *Ann. Entomol.* **95** (3): 379-386.
- Varenes, A. (2003). *Produtividade dos Solos e Ambiente*. Escolar Editora, Lisboa.

- Walkley, A. 1946. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.*, **63**: 251-263.
- Wang, H., Rehman, K., Liu, X., Yang, Q., Zheng, L., Li, W., Cai, M., Li, Q., Zhanf, J. and Yu, Z. (2017). Insect biorefinery: a green approach for conversion of crop residues into biodiesel and protein. *Biotechnol. Biofuels* **10**: 13 pp.
- Wang, Y. e Shelomi, M. (2017). Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* **6** pp.23.
- Weil, S. (2015). *Calcium and Potassium Accumulation in Lettuce under Different Nitrogen Regimes*. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master. University of Massachusetts Amherst.
- Zahn, N.H. (2017). *The effects of Insect Frass created by Hermetia illucens on Spring Onion Growth and soil Fertility*. Dissertation submitted for the degree of Bachelor. Department of Biological and Environmental Science – University of Stirling.

Referências bibliográficas eletrônicas

- <http://www.fao.org/faostat/en/#home>, acessido a 26.7.2019 e a 10.10.2019, para o parâmetro da produção de alface (e chicória) em Portugal e no mundo.
- <https://www.entogreen.org/pt/>, acessido a 10.10.2019 e 10.1.2020.
- https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/217341?lg=en , acessido em 7/4/2020, para a fotografia da MSN.
- EIP-Agri (2019). Focus Group Circular Horticulture – Final Report. EU Comissão, <https://ec.europa.eu/eip/agriculture/en/publications/eip-agri-focus-group-circular-horticulture-final>

Referências a legislações ou normas

- Decreto-lei nº.103/2015 de 15 de junho. *Diário da República*, 1ª série, nº. 114 de 15 de junho. Ministério da Economia. Lisboa.

Anexo

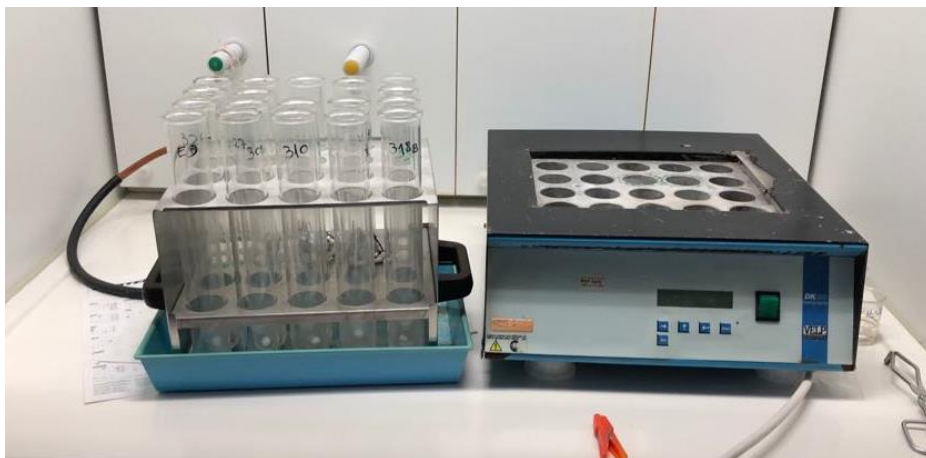


Figura 16 - Unidade de digestão para a determinação de N-Kjeldahl e respectivos tubos.



Figura 17 - Unidade de destilação Kjeltec 1026, para a realização do método de Kjeldahl.



Figura 18 - Espectrofotômetro de absorção molecular Thermo Scientific Evolution 201, para a determinação de P.



Figura 19 - Espectrofotômetro de absorção atômica Thermo Scientific iCE 3000 series, para a determinação de Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu.



Figura 20 - Fotômetro de chama da Sherwood Scientific modelo 410, para a determinação de K e Na.



Figura 21 - Espectrofotômetro, usado nos ensaios das enzimas, Specgene da Techne (descontinuados, agora são produzidos pela Jenway©).



Figura 22 - À esquerda a centrífuga 5415 C e à direita a centrífuga MiniSpin®, ambas da Eppendorf.

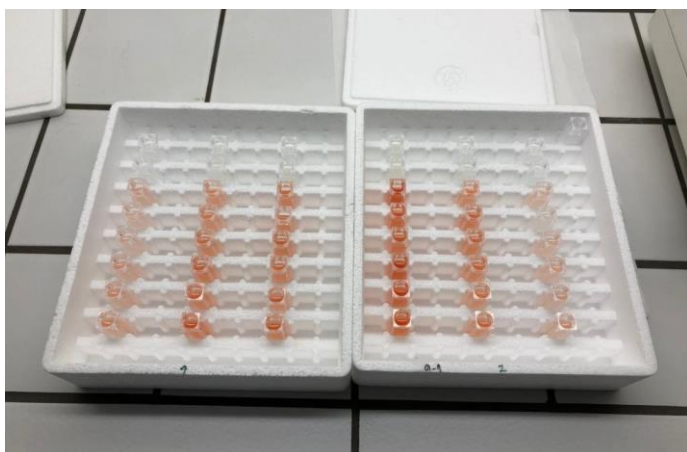


Figura 23 - Resultados do ensaio da atividade enzimática de desidrogenase, na seguinte ordem: T0, T1, T2, T3, T4 e Tm (cada ensaio representa 1 repetição, das 5 repetições delineadas). Esta fotografia mostra a intensidade da cor dos sobrenadantes, evidenciando a grande diferença dos níveis de atividade entre as modalidades.

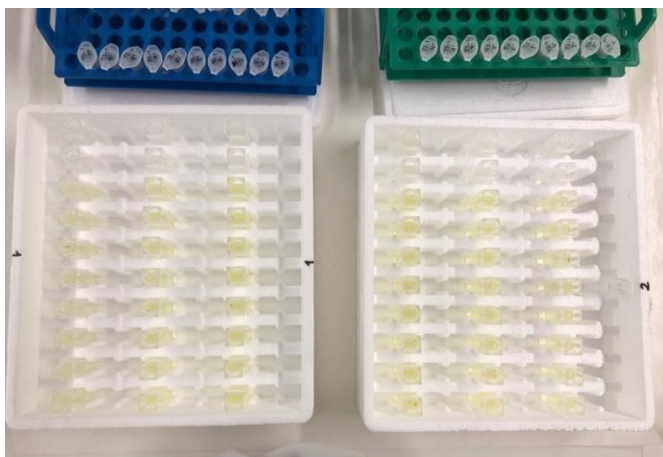


Figura 24 - Resultados do ensaio da atividade enzimática de desidrogenase, na seguinte ordem: T0, T1, T2, T3, T4 e Tm (cada ensaio representa 1 repetição, das 5 repetições delineadas).